

生命科学实验指南系列

蛋白质纳米技术
——方案、仪器和应用

Protein Nanotechnology
Protocols, Instrumentation, and Applications

〔美〕武亭俊（Tuan Vo-Dinh） 主编

朱必凤 赵三银 刘博婷 曾松荣 译



科 学 出 版 社

(Q-3889.31)

人类基因组计划的完成，大大促进了生命科学的发展，人类基因序列的了解展现了生老病死的蓝图；催生了后基因组学、蛋白质组学、生物工程和精准医学的深入研究。然而，这些基因表达的数以万计的蛋白质是如何在生命系统中工作和协调的？它们是如何相互作用和进行信号传导的？细胞内复杂的生物化学动态变化如何？重要疾病（如癌、阿尔茨海默病、囊性纤维化等）与特定基因和蛋白质的变化有关，如何诊断和早期发现并治疗？药物治疗和细胞应答的跟踪，预防治疗潜在的药物靶点的确定等，目前的技术还不能达到和满足上述工作的要求。蛋白质纳米技术的应用和发展，为上述问题的解决提供了全新的思路、方法和途径。本书呈现最近纳米科学和技术的进展，以及实用的方法和应用，包括各种各样的有关蛋白质纳米技术的重要课题。每章提供了感兴趣项目的概述材料介绍、提供方法、设计方案、仪器和应用，同时收集了大量的公开数据。


生命科学实验指南系列

- 现代分子生物学实验原理与技术
- 现代神经科学研究技术
- DNA微阵列实验指南
- 植物生物学与生态学实验
- 基因转移——DNA和RNA的转运与表达
- 分子克隆实验指南（第三版）（上下册）
- 精编人类遗传学实验指南
- 酵母遗传学方法实验指南
- 环境基因组学实验指南
- 单分子技术实验指南
- 遗传变异分析实验指南
- 表皮细胞实验指南
- 神经生物学实验原理与技术
- 现代蛋白质工程实验指南
- 实验动物血液生理生化参考手册
- 病毒的电子显微学研究
- 图解微生物实验指南
- 元基因组学：方法和步骤（影印版）
- 活细胞成像（第二版）
- 生物衰老：研究方法与实验方案
- 真核生物转录调控——概念、策略与技术（第二版）
- 蛋白质纯化指南（原书第二版）
- 分子克隆实验指南（第四版）（原版）
- 麦类作物转基因技术与田间鉴定实验指南
- 动物细胞培养——基本技术和特殊应用指南（原书第六版）
- 蛋白质纳米技术——方案、仪器和应用



科学出版中心 生物分社
联系电话：010-64012501
E-mail：lifescience@mail.sciencep.com
网址：http://www.lifescience.com.cn


科学出版社互联网入口


生命科学订阅号
赛拉艾芙


本书彩图及更多
信息请扫码

生命因你而精彩！

www.sciencep.com



销售分类建议：分子生物学；生物技术

定 价：168.00 元

生命科学实验指南系列

蛋白质纳米技术
——方案、仪器和应用

Protein Nanotechnology:
Protocols, Instrumentation, and Applications

〔美〕武亭俊（Tuan Vo-Dinh） 主编

朱必凤　赵三银　刘博婷　曾松荣　译

科学出版社

北　京

图字：01-2016-5512 号

内 容 简 介

人类基因组计划的完成，大大促进了生命科学的发展，人类基因序列的了解展现了生老病死的蓝图；催生了后基因组学、蛋白质组学、生物工程和精准医学的深入研究。然而，这些基因表达的数以万计的蛋白质是如何在生命系统中工作和协调的？它们是如何相互作用和进行信号传导的？细胞内复杂的生物化学动态变化如何？重要疾病（如癌、阿尔茨海默病、囊性纤维化等）与特定基因和蛋白质的变化有关，如何诊断和早期发现并治疗？药物治疗和细胞应答的跟踪，预防治疗潜在的药物靶点的确定等，目前的技术还不能达到和满足上述工作的要求。蛋白质纳米技术的应用和发展，为上述问题的解决提供了全新的思路、方法和途径。本书呈现最近纳米科学和技术的进展，以及实用的方法和应用，包括各种各样的有关蛋白质纳米技术的重要课题。每章提供了感兴趣项目的概述材料介绍、提供方法、设计方案、仪器和应用，同时收集了大量的公开数据。

本书可供生物学、分子生物学、生物化学、生物技术、医药卫生、生物医学、材料科学、动物医学及对学科间交叉研究和开发感兴趣的科学家、工程师、制造商等方面的科研、教学与技术人员参考。

Translation from the English language edition:
Protein Nanotechnology
Protocols, Instrumentation, and Applications
edited by Tuan Vo-Dinh

图书在版编目(CIP)数据

蛋白质纳米技术：方案、仪器和应用/（美）武亭俊（Tuan Vo-Dinh）主编；朱必风等译. —北京：科学出版社，2017.1
（生命科学实验指南系列）
书名原文：Protein Nanotechnology: Protocols, Instrumentation, and Applications
ISBN 978-7-03-050342-8
Ⅰ. ①蛋… Ⅱ. ①武… ②朱… Ⅲ. ①纳米技术—应用—蛋白质工程 Ⅳ. ①TQ93
中国版本图书馆 CIP 数据核字（2016）第 256970 号

责任编辑：王 静 岳漫宇 / 责任校对：郑金红
责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科学出版社出版
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com

北京东华虎彩印刷有限公司印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销

2017 年 1 月第 一 版 开本：787×1092 1/16
2017 年 1 月第一次印刷 印张：21.5
字数：504 000

定价：168.00 元
（如有印装质量问题，我社负责调换）

本书撰稿人

- ROD BALHORN　美国加利福尼亚州利弗莫尔市，劳伦斯利弗莫尔国家实验室，生物学和生物技术研究项目组。
- EMMERICH BERTAGNOLLI　奥地利维也纳市，维也纳工业大学固态电子研究所。
- WILFRID BOIREAU　法国贝桑松市，国家研究中心，弗朗什孔泰热机械和光学-电子科学与技术研究所混合研究单位617U，LPMO部门。
- YAROSLAV I. BURYANOV　俄罗斯莫斯科普希诺市，俄罗斯科学院舍米亚金分部，Ovchinnikor生物有机化学研究所植物生物技术实验室。
- HUA CHEN　美国加利福尼亚州，美国航空航天局艾姆斯研究中心、纳米技术研究中心，莫菲特试验场。
- JARROD CLARK　美国加利福尼亚州杜阿尔特市，希望之城国家医疗中心卡普兰临床研究实验室。
- MONIQUE COSMAN　美国加利福尼亚州利弗莫尔市，劳伦斯利弗莫尔国家实验室生物学和生物技术研究小组。
- LAURA E. CROCITTO　美国加利福尼亚州杜阿尔特市，希望之城国家医疗中心卡普兰临床研究实验室。
- MUSTAFA CULHA　美国田纳西州橡树岭市，橡树岭国家实验室高级生物医学科学和技术小组。
- RAJESH DABUR　美国加利福尼亚州杜阿尔特市，希望之城国家医疗中心卡普兰临床研究实验室。
- ANTHONY C. DUNCAN　法国贝桑松市，法国国家科学研究中心，振荡器，微观技术研究所，物理和计量实验室。
- BRUCE DUNN　美国加利福尼亚州洛杉矶市，加利福尼亚大学洛杉矶校区材料科学和工程系。
- J. JUSTIN GOODING　澳大利亚悉尼市，澳大利亚新南威尔士大学化学学院。
- PEIXUAN GUO　美国印第安纳州西拉斐特市，普渡大学病理学系。
- GUY D. GRIFFIN　美国田那西州橡树岭市，橡树岭国家实验室高级生物医学科学和技术小组。
- ERIKA GYÖRVARY　奥地利维也纳新城，奥地利集成微系统。

- QUAMRUL HASAN　日本石川县，日本高级科学与技术学院科学和技术发展战略中心(21世纪卓越计划中心)。
- MARKUS JANOTTA　美国佐治亚州亚特兰大市，佐治亚理工学院化学和生物化学学院。
- NIGIL SATISH JEYASHEKAR　美国田纳西州橡树岭市，密西西比大学化学工程系，大学硕士。
- CHRISTINE KRANZ　美国佐治亚州亚特兰大市，佐治亚理工学院化学和生物化学学院。
- VISWANATHAN V. KRISHNAN　美国加利福尼亚州利弗莫尔市，劳伦斯利弗莫尔国家实验室生物学和生物技术研究小组。
- ANGELIKA KUENG　日本石川县，日本高级科学与技术学院材料科学学院。
- ESTHER H. LAN　美国加利福尼亚州洛杉矶市，加利福尼亚大学洛杉矶校区材料科学和工程系。
- JUN LI　美国加利福尼亚州，美国航空航天局艾姆斯研究中心、纳米技术研究中心，莫菲特试验场。
- ALOIS LUGSTEIN　奥地利维也纳市，维也纳工业大学固态电子研究所。
- ANNA MITRAKI　法国格勒诺布尔市，生物结构研究所。
- BORIS MIZAIKOFF　美国佐治亚州亚特兰大市，佐治亚理工学院化学和生物化学学院。
- ALEXANDRA MOLINELLI　美国佐治亚州亚特兰大市，佐治亚理工学院化学和生物化学学院。
- YASUTAKA MORITA　日本石川县，日本高级科学与技术学院材料科学学院。
- HOU TEE NG　美国加利福尼亚州，美国航空航天局艾姆斯研究中心纳米技术研究中心，莫菲特试验场。
- DENIS POMAPON　法国伊维特河畔，法国国家科学研究中心，分子遗传中心，膜蛋白工程实验室。
- DIETMAR PUM　奥地利维也纳市，博库生命科学自然资源和应用大学，纳米生物技术研究中心。
- AJIT SADANA　美国田纳西州橡树岭市，密西西比大学化学工程系和复合结构系，超微工程研究小组，大学硕士。
- BERNHARD SCHUSTER　奥地利维也纳市，博库生命科学自然资源和应用大学，纳米生物技术研究中心。

- JOE G. SHAPTER　澳大利亚阿德莱德市，南澳大利亚弗林德斯大学化学、物理和地球科学学院。
- TARAS SHEVCHUK　美国加利福尼亚州杜阿尔特市，希望之城国家医疗中心卡普兰临床研究实验室。
- UWE B. SLEYTR　奥地利维也纳市，博库生命科学自然资源和应用大学，纳米生物技术研究中心。
- STEVEN S. SMITH　美国加利福尼亚州杜阿尔特市，希望之城国家医疗中心卡普兰临床研究实验室。
- DAVID L. STOKES　美国田纳西州橡树岭市，橡树岭国家实验室高级生物医学光子学中心。
- PIOTR M. SWIDERSKI　美国加利福尼亚州杜阿尔特市，希望之城国家医疗中心卡普兰临床研究实验室。
- YASUHIKO TABATA　日本京都，京都大学前沿医学科学研究所生物材料系。
- EIICHI TAMIYA　日本石川县，日本高级科学与技术学院材料科学学院。
- MUSUNDI B. WABUYELE　美国田纳西州橡树岭市，橡树岭国家实验室高级生物医学科学和技术小组。
- MARK J. VAN RAAIJ　西班牙圣地亚哥市，圣地亚哥大学生物化学与分子生物学系、药学系。
- PETER G. VEKILOV　美国得克萨斯州休斯顿市，休斯顿大学化学工程系。
- PIERRE M. VIALLET　法国佩皮尼昂市，佩皮尼昂大学，集成系统物理化学生物实验室；美国田纳西州橡树岭市，橡树岭国家实验室，高级生物医学科技集团。
- TUAN VO-DINH　美国田纳西州橡树岭市，橡树岭国家实验室，生命科学部，高级生物医学光子学中心。
- FEI YAN　美国田纳西州橡树岭市，橡树岭国家实验室高级生物医学光子学中心。
- ZHENG-LIANG ZHI　日本石川县，日本高级科学与技术学院材料科学学院。
- JEFFREY I. ZINK　美国加利福尼亚州洛杉矶市，加利福亚尼大学洛杉矶校区化学和生物化学系。

序　言

本书旨在为基因组学、蛋白质组学、生物工程和医学中广泛使用纳米技术进行学习、教学、研究和实践的工作者提供权威参考资料。最近，在研究、材料和品种的开发长度达到了 1～100nm 的纳米技术，使许多重要的科学领域，从生物学到医学发生了革命性变化。这种分子规模的技术，具有开发更小仪器和比任何目前可用的仪器更高效的潜力。为了在细胞水平上理解复杂的生物纳米系统，我们迫切需要发展新一代纳米技术工具。我们相信，在未来的几十年，基因工程、基因组学、蛋白质组学、医药和生物技术的新进展将取决于我们掌握纳米技术的多少。纳米技术、材料科学和分子生物学的结合，开启了用纳米仪器测定和操纵原子与分子的可能性，同时在种类繁多的生物学研究课题及细胞水平的医疗用途方面，有许多潜在的应用。

今天，由于这些新的纳米工具非常有效，生物医学科学和生物工程在分子水平上的研究数量正在以指数级增长。它们能够探测纳米世界并表征细胞的化学和力学性能，发现新的现象和过程，并为研究人员提供广泛的工具、材料、设备和具有独特特点的系统。

人类基因组的测序、蛋白质组学完成后的最大影响之一，是建立了一个全新的方法对生物学和医学进行研究。蛋白质是维持细胞正常功能中起重要作用的主要细胞成分。纳米技术承诺，为细胞中数以万计的蛋白质（即所谓的蛋白质组）是如何与生命化学网络进行和谐协同工作的研究提供工具。特定的基因和蛋白质与多种疾病和失调有关，包括乳腺癌、肌肉疾病、耳聋和失明。蛋白质错误折叠过程被认为是造成这种疾病的病因，如阿尔茨海默病、囊性纤维化、“疯牛”病、遗传性肺气肿，甚至许多癌症等。在后基因组时代的诊断、治疗和药物发现领域，纳米技术也有令人瞩目的潜力。纳米技术和光学分子探针的组合，正在开发以识别分子变化，从而区分正常细胞与患病细胞的技术。这样的技术将最终有助于表征和预测患病细胞的病理行为及细胞对药物治疗的响应性。

生物学和纳米技术的组合已经导致了新一代设备的诞生，这些设备用于探测细胞体系和阐明迄今人们未知的分子水平的生命过程。现在能在体内使用荧光分子探针和纳米传感器，跟踪细胞内的生物化学过程。科学家使用功能强大的近场光学显微镜工具，以前所未有的分辨率，探索活细胞的生化过程和亚显微结构。目前能够开发用于递送药物的纳米载体，被递送的药物外表面偶联有靶向抗原的抗体和用于活体细胞内跟踪药物的荧光发色基团。

本书展示最新的纳米科学和技术的进展，以及实用的方法和应用，包括各种各样的有关蛋白纳米技术的重要课题。每章提供了感兴趣话题的概述介绍材料；提供方法、设计方案、仪器和应用，同时收集了大量的公开数据和参考文献供进一步研究参考。

撰写《蛋白质纳米技术——方案、仪器和应用》的目的是，为对各学科间交叉研究和开发感兴趣的科学家、工程师、制造商、教师和学生提供基因组学、蛋白质组学相关的纳米技术，以及在仪器、方法和应用方面的最新进展的综合综述。

Tuan Vo-Dinh

致　谢

在许多朋友和同事的协助下本书工作得以完成。在这里我想衷心感谢对本书章节作出贡献的撰稿人。他们对本书出色的工作和缜密的建议在本书的广度和深度方面起到了重要作用。我非常感谢橡树岭国家实验室(ORNL)和学术界许多同事帮助阅读和评论手稿的各个章节提出的宝贵意见。我要感谢我的行政助理 Julia B. Cooper 多年来在橡树岭国家实验室中的奉献精神、效率和及时的援助。我还要感谢 Brian Davison、Reinhold Mann 和 Lee Riedinger 博士；美国能源部 Michael Viola 和 Dean Cole 博士在他们事业上自始至终的支持。我要诚挚感谢美国能源部生物和环境研究办公室、美国国立卫生研究院、美国司法部、联邦调查局、美国海军研究办公室、美国环境保护署对我的赞助和支持。本工作的完成成为可能与我的妻子 Kim-Chi 和我的女儿 Jade 的鼓励、爱及灵感分不开。

目　录

第 1 章　蛋白质纳米技术——生物科学新前沿

Tuan Vo-Dinh

概　　述

纳米技术和分子生物学的结合，为人类在分子水平上探索细胞机制和阐明迄今未知的精密生命加工过程，开创了基于纳米级设备和方法的新时代。本章提供纳米技术领域的简要综述及其蛋白质系统在生物学和医学中的研究、设计和应用。

关键词：纳米技术；蛋白质；纳米传感器；纳米探针；DNA；RNA；分子马达

1.1　导论：纳米技术的历史远景

纳米技术是研究和开发 1～100nm 的材料和物质。纳米术语“nano”来自希腊文，意思是“微小”。在维度上，nano 指的是 10^{-9}，即一个单位的十亿分之一。因此，纳米是 10^{-9}m（0.000 000 001m），或约一个分子（如苯）的大小。因此纳米技术是指用于研究、设计和在纳米尺度人工制造的技术和方法。以纳米数据研究材料和生物系统的最初概念来自于 40 多年前（译者注：原书出版于 2005 年）的 1959 年，Richard Feynman 在加利福尼亚州理工学院美国物理学会年会上作的一次，题为 *There's plenty of room at the bottom*（“底下的空间还大得很”）[1]的报告，这被认为是以纳米水平观察材料、物质和结构世界的源头。

纳米结构在大小上与许多生物物质如蛋白质相类似。这些物质包括各种各样的基本结构，如多聚物、碳水化合物（糖）和脂质，尽管它们在化学、物理和功能特性上有很大的不同。这些生物纳米材料和系统多样性，以及易变性对设计、开发和制造应用于工业、生物技术和医学中的关键新型人工组件（如脂质囊泡、树枝状聚合物、DNA 的聚集体和纳米杆或管）具有重要意义。

为了在细胞水平上了解复杂的生物纳米系统，我们迫切需要发展新一代纳米技术的工具盒。这就是分子级的技术，它有潜力开发更小，同时比目前可见到的任何仪器更有效的设备。我们相信在未来几十年，基因工程、基因组学、蛋白质组学、医药和生物技术的新进展，将取决于我们掌握了多少纳米技术。如果我们能够在原子和分子水平上组装生物系统和设备，我们将实现一个多功能、构造精细而此前很难操控的梦想。这个梦就是 Eric K. Drexler 在他的 *Engines of Creation*（《创造的发动机》）[2]一书中预见的那样，他设想分子技术的主要过程可能是蛋白质工程。

1.2　蛋白质纳米技术的重要性

具有无数生物学成分的活细胞，将来可能是终极纳米设备。如图 1.1 所示，具有其各个组成部分的细胞示意图。表 1.1 给出了蛋白质和生物物质的一些典型大小。化学也涉及纳米大小的原子和分子。然而，纳米技术不同于化学的基本概念。化学涉及的大宗水平原子和分子（在化学溶液中我们看不到分子），纳米技术实际上探索以非常特殊的方式“操纵”单个原子和分子。



图 1.1　细胞和细胞内组分示意图（彩图请扫封底二维码）

表 1.1　蛋白质与生物物质的典型大小

生物种类	样品	典型大小	典型分子质量/Da
小蛋白	胰凝乳蛋白酶	4nm 球形	10^4～10^5
大蛋白	天冬氨酸转氨甲酰酶	7nm 球形	10^5～10^7
小聚集体	核糖体	20nm 球形	10^5～10^7
大聚集体	病毒	100nm 球形	10^7～10^{12}
核酸	tRNA	10nm 杆形	10^4～10^5

蛋白质是细胞的主要成分，它在维持细胞功能方面发挥着重要作用。蛋白质具有许多功能，它们可以作为驱动生物化学反应推动力的酶，它也可以作为识别入侵成分的抗体，并允许免疫系统中和与消除不必要的入侵者。在细胞或有机体中，蛋白质具有生理功能及病理生理功能，因为疾病、治疗和药物可改变蛋白质谱。蛋白质谱的测定对于了解疾病和设计治疗药物能提供有用的信息。因此，在分子（如纳米）水平上理解蛋白质的结构、代谢和功能，对于我们了解生命过程是绝对关键的。这方面的知识将有助于提

高我们在分子制造中操控生物物质的能力，利用基于生物燃料的微生物系统提高能源生产或检测生物健康状况，从而有效诊断并最终预防疾病。

蛋白质和基因密切相关。简言之，在染色体中 DNA 的遗传密码被转录成 RNA 的对应序列，然后由核糖体编码氨基酸序列。这些氨基酸链折叠成一个三维（3D）结构，成为一个特定的蛋白质，其目的是在细胞或身体的某些部分执行特定作用。例如，一些蛋白质以非活性的形式存在，然后在蛋白质的活性位点经酶促切割成为一种新的活性结构。最近我们已认识到称为分子伴侣蛋白的特殊类型蛋白质的重要性。这些蛋白质被设计用来协助细胞内的其他蛋白质折叠成其最终形状和功能。基因也可以经过不同的剪接和翻译后修饰产生几种活性形式的蛋白质。因此，基因序列信息的知识不足以描述生命，但它对确定生命过程中相关蛋白质起实际作用的功能非常关键。

1.3　蛋白质结构：基本构件

蛋白质如项链上的珠子一样，是由大量的氨基酸组装成聚合物的长链分子。聚合物主链上的氨基酸的序列是蛋白质的一级结构。正常情况下有 20 种氨基酸。典型的多肽链包含 100～600 个氨基酸分子，相对分子质量为 15 000～70 000。由于氨基酸具有亲水基、疏水基和两性电解质基团，在水环境中，它们折叠形成局部排序，即三维结构，称为二级结构，其特征为亲水基在外疏水基在内的低能量构型。一般情况下，简单的蛋白质有一种天然的α-螺旋结构。另一种天然的二级结构是β-折叠。这些二级结构（α-螺旋和β-折叠）通过大量的次级键相互作用，如范德瓦耳斯力组装成最终的三级结构。三级结构是一个不可分割的蛋白质单元（即一个单一的共价物质）的完整的三维结构。有时，一些蛋白质结合在一起，以形成超分子聚集体组成四级结构，这是结构的最高层次，由独立的三级结构单元的非共价结合而形成。

了解蛋白质的三维结构是理解其功能必不可少的知识。序列（一级结构）提供有关蛋白质功能的信息很少。为了执行其功能，蛋白质必须具备一种特殊结构，经过折叠过程，通常称为活性形式。图 1.2 显示牛血清白蛋白（BSA）的三维结构。折叠蛋白如卵清蛋白，可以通过加热而去折叠。随着进一步加热，清蛋白经历一个不可逆的折叠构型变化，变为白色。这种构型的白蛋白是变性。变性白蛋白不能恢复自然构型。然而，有些蛋白质可反复变性和复性；也就是说，它们可以不折叠和折叠回到其自然的构型。疾病如阿尔茨海默病、囊性纤维化、疯牛病、遗传性肺气肿，甚至许多癌症的起因都是蛋白质错误折叠造成的。

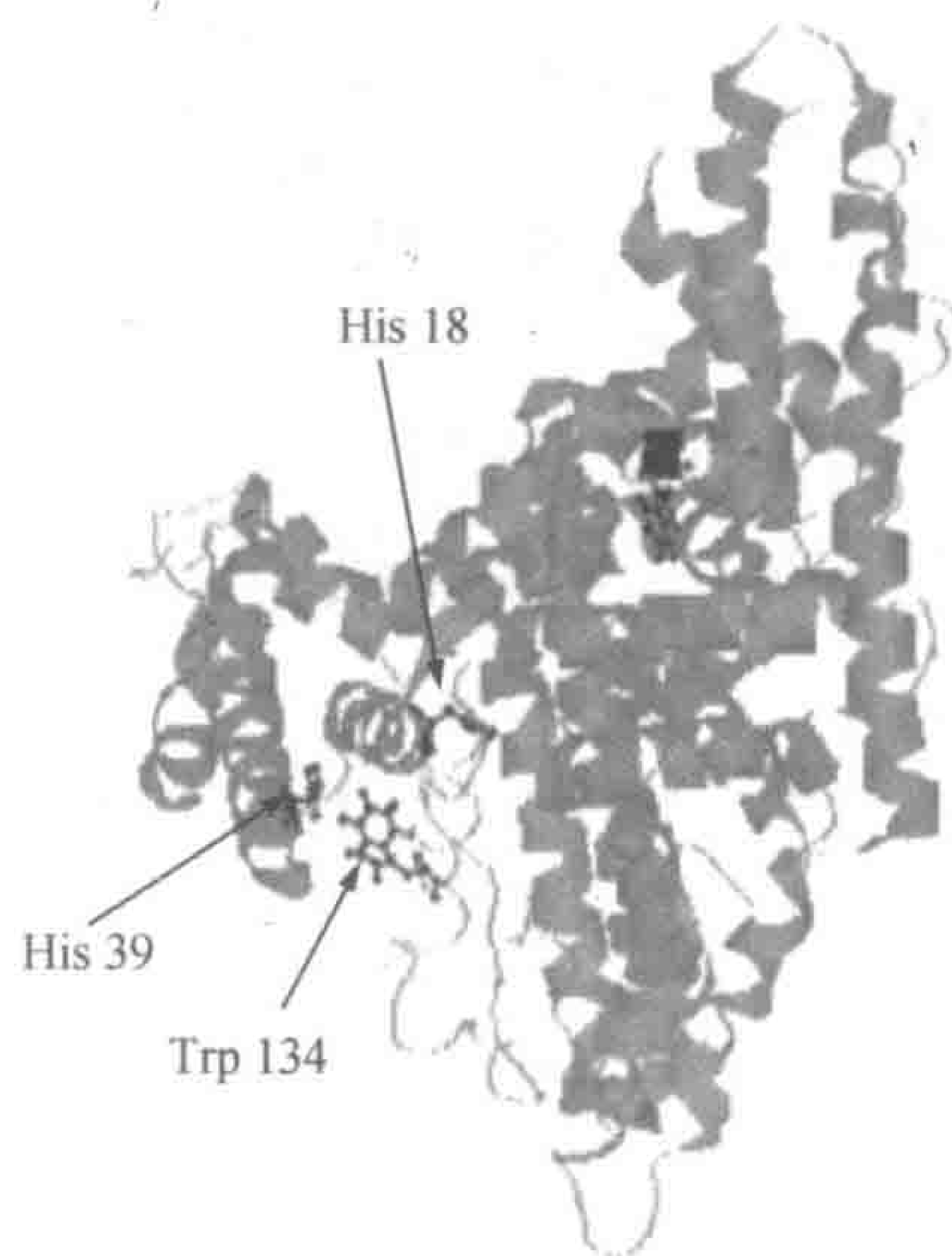


图 1.2　牛血清白蛋白的三维结构

广泛的实验和理论研究一直致力于确定蛋白质的结构。借助于计算方法、质谱和核磁共振（NMR）的

组合技术，研究人员已经鉴定最佳组合小分子，用于合成双配基解毒剂或用于梭菌神经毒素如破伤风和肉毒杆菌的检测试剂。破伤风毒素片段 C 的晶体结构（TetC，蛋白质数据库登记号为 1A8D）计算显示，阿霉素和肽分别停靠在位点 1 和位点 2，如图 1.3 所示。唾液酸和薰草菌素（lavendustin）A 的结构证明，核磁共振叠加图显示，薰草菌素 A 与破伤风毒素片段 C（TetC）结合[3]。



图 1.3　破伤风毒素 C 片段（TetC）的结晶结构（彩图请扫封底二维码）

了解细胞内综合加工的蛋白质结构和功能，通常被称为“系统生物学”，它提出了一个巨大的挑战，比测定人类基因组的相关数据要困难得多。因此，蛋白质组学测定细胞中的蛋白质结构和功能，可能是一个比基因组学更具挑战性的研究领域。蛋白质组学研究方向可以被归类为结构和功能。结构蛋白质组学或蛋白质的表达，测定正常和患病细胞内蛋白质的数量和类型。这种方法对定义细胞中蛋白质的结构非常有用。然而，蛋白质在疾病中的作用不能简单地根据结构来定义。蛋白质的一个重要的功能是信号通过复杂的蛋白质通路进行传输。蛋白质间及与其他的有机分子相互作用形成通路。功能蛋白质组学包含细胞内蛋白质的相互作用和信号转导途径，以及它们与疾病过程的联系。阐明蛋白质在信号通路中的作用，从而更好地了解它们在细胞行为和疾病诊断的作用，最后为预防治疗确定潜在的药物靶点。本书中的各个章节中介绍蛋白质纳米技术需要的关键工具，以获取有关细胞信号转导过程中的实时信息。

1.4　蛋白质机器：生命的天然引擎

有一系列生物分子的纳米机器在细胞体系中的作用才有了生命。通过超过万亿代的进化修饰，生物体才有了一套完善的分子机器、结构和加工的兵工厂。最简单的细胞用纳米级操控构建分子尺度的物体。它们根据 DNA 中编码所定义的指令用一个原子一个原子来构建蛋白质和其他分子。细胞机器使用多种形式的旋转轴承，例如，在一些最简

单细菌中的蛋白质系统，被用作环形 DNA 和沿其长度滑动的夹子。人类细胞中含有一种用于产生能量的旋转马达。细胞用非常多样性的分子选择泵用于吸收离子、氨基酸、糖、维生素，以及生活所需的所有营养。细胞还用分子传感器检测环境中的分子浓度并计算出适当的功用结果。

核糖体是已知的分子机器。核糖体是在活细胞中担当纳米机器作用的生物物质。核糖体构建的蛋白质是细胞功能必不可少的物质，尽管典型的核糖体只有 $8000nm^3$，但这种纳米机器能够根据宿主 DNA 复制的信使 RNA 指令，以精密线性序列把氨基酸串在一起制造几乎任何蛋白质。为了执行其分子制造任务，核糖体控制专一性转移 RNA（tRNA），依次由专一性酶对专一性的氨基酸进行化学键合。它有办法控制生长中的多肽并引起专一性氨基酸与其反应，使氨基酸从多肽末端加入到肽链中。换言之，DNA 可被认为是细胞机器的生物软件，核糖体是大型分子建造师，酶是有效的分子装配工。这些蛋白质是真正的生命过程的天然引擎。

细胞用其他基于蛋白质的纳米机器分离细胞分化过程中的染色体，搬运材料，爬行到表面，将自己推入水中。例如，在动物细胞中的细胞分裂，微管（直径 25nm 的中空圆筒）的拆装，将备份的 DNA 运输到两个新的子细胞中。另一已知的分子马达——肌球蛋白的运动，沿着称为肌动蛋白的双螺旋细丝（直径大约 10nm），在每次心跳期间产生肌肉细胞的收缩。

经典和量子分子模拟方法，已经为纳米材料的开发和纳米技术设计的可行性研究中，提供了一个宝贵的工具（图 1.4）。例如，由同心碳纳米管组成的模型纳米轴和纳米马达的基本经典和量子模拟研究，已经表明对完成马达和轴承内部的模式耦合关键方面有强烈影响。在过去的几年中，Noid 和 Sumpter 采用完全动态的（分子动力学）模拟完成了纳米轴承、纳米马达及流体碳纳米管流动的研究[4,5]。最近在纳米文献中推荐了各种类型的分子轴承和其他机械装置。纳米技术发展后期衍生的一种期望和纳米技术自身的一个有趣科学问题，就是在纳米水平上引用控制动作。在与分子轴承密切相关的开发研究方面，Noid、Tuzun 和 Sumpter 等已经模拟了几个激光驱动纳米石墨马达模型（图 1.5）。电机包括两个同心的石墨汽缸（轴和轴套），配有一个正电荷和一个负电荷附着到轴末端环之一的相对端。轴的旋转运动是通过施加一个或有时两个振荡激光场诱导。在拟钟锤运动和单向旋转（电动机样行为）周期之间进行轴循环。图 1.5 所示的电机性能如功能大小、磁场强度和频率，以及所连接的正电荷和负电荷的相对位置的函数。借鉴在小分子系统中多元激光增强能量吸收的观察素描，Noid 和 Sumpter 也绘制了表现单对双激光激发功能的马达。

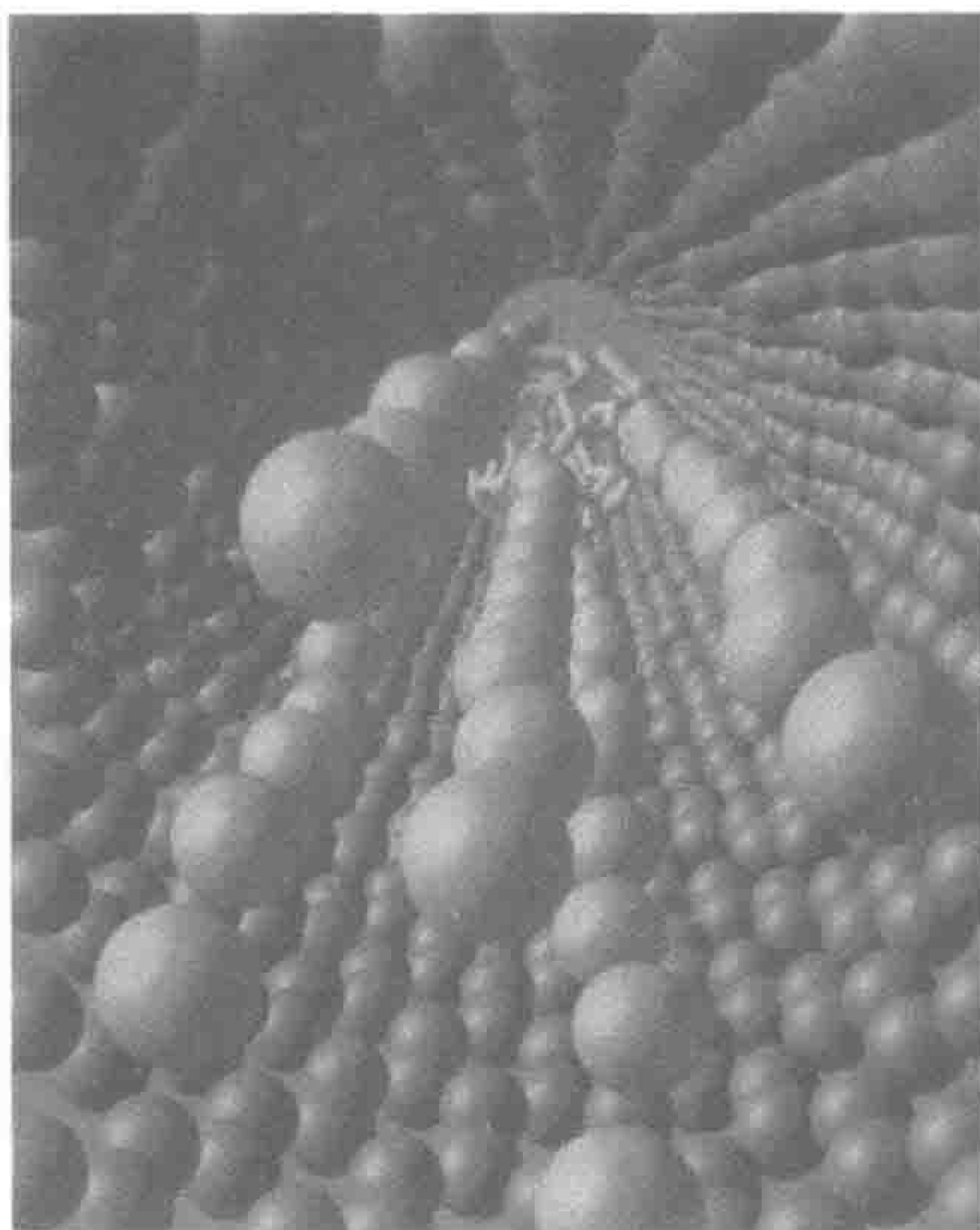


图 1.4　利用经典和量子分子模拟方法的纳米结构设计的例子（摘自并经允许 Sumpter 和 Noid 个人通信）

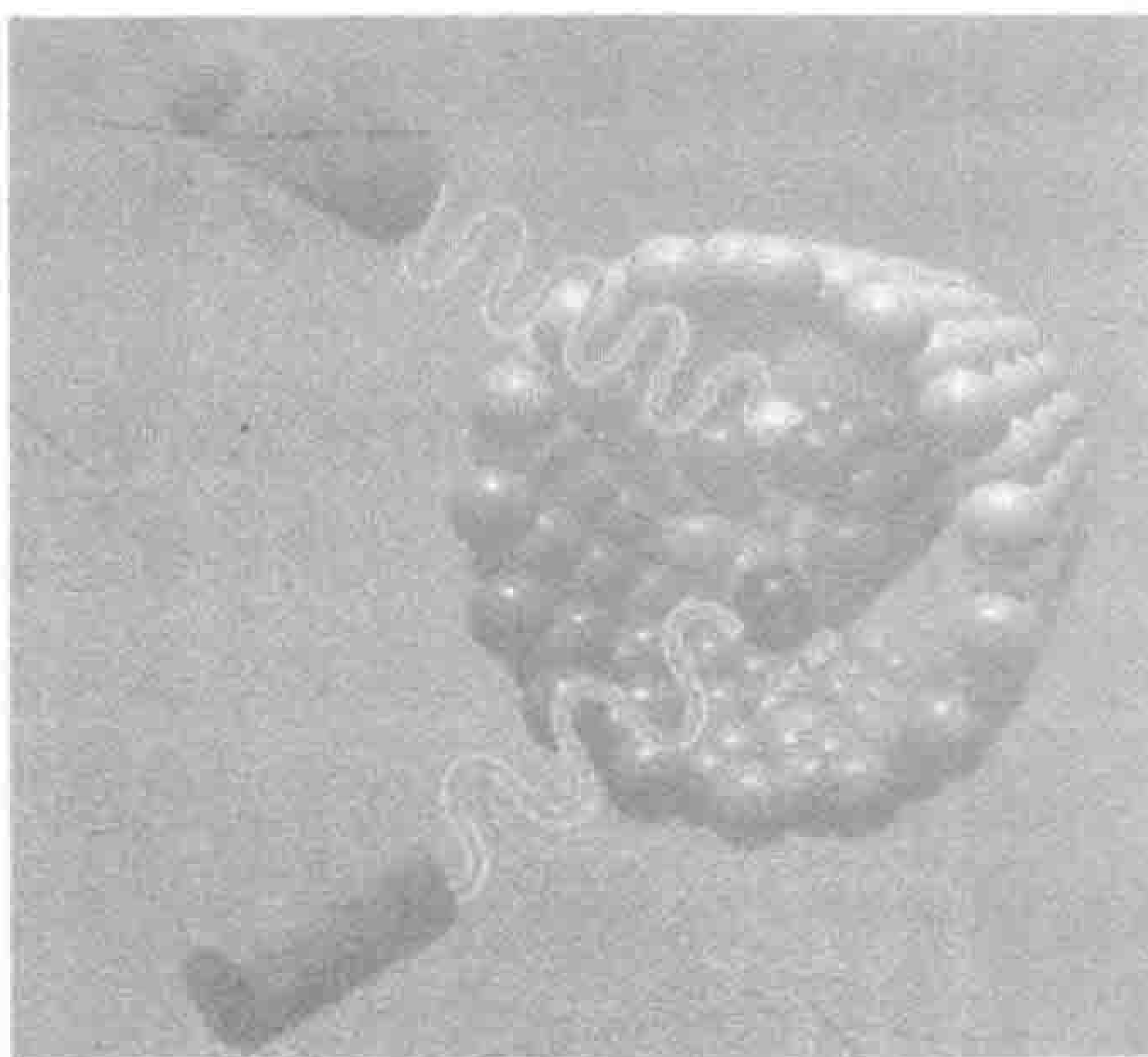


图 1.5　利用仿真方法设计的激光驱动纳米石墨马达模型。激光驱动马达由两个同心石墨汽缸（轴和轴套）组成，一端连接正电荷，一端连接负电荷，电荷与轴末端相反（摘自 Noid 等[5]）

1.5　纳米工具盒

最近，纳米技术已经使分子生物学的许多重要领域发生了彻底变革，特别是在分子和细胞水平上检测和操纵蛋白质和生物物质。分子生物学技术和纳米技术的组合开创了用纳米设备测定和操纵原子和分子的新纪元，具有细胞水平上广泛多样医学用途的潜能。

现在，由于基于蛋白质纳米技术开发的新的纳米研究工具非常实用，使得以分子水平对生物医学科学和工程进行的大量研究呈指数发展。这些新分析工具能够探测纳米世界并可能表征细胞的化学和力学性能，发现新的现象和过程，并提供科学与多样的工具，

包括材料、设备和具有独特特点的系统。电子、生物材料、分子生物学和纳米技术，有望在 21 世纪彻底改变生物学和医学的许多领域。

纳米技术和分子生物学的结合已经导致了新一代设备的诞生，用于探索细胞体系和阐明迄今人类未知分子水平的生命过程。采用荧光分子纳米探针和纳米传感器跟踪细胞内环境中的生化过程[6]。使用功能强大的近场光学显微镜工具，科学家现在能以前所未有的分辨率，探索活细胞的生化过程和纳米结构，开发靶向递送药物的纳米载体，该载体具有靶向抗原和在体内跟踪荧光染色体的作用。

开发能产生表面增强效率超灵敏生化分析的金属纳米探针，是活跃在纳米领域研究的另一个热点。在研究领域提到的等离子体涉及金属纳米结构电磁性能的增强。该术语来自于等离子体振子，就是物质通过大量电子集体运动与纵波传播有关的量子。入射光照射这些表面，激发金属中电子传导并诱导表面等离子体振子的激发，反过来，通过表面增强拉曼散射（SERS）[7]和表面增强荧光，导致特殊信号超灵敏探测电磁的巨大增强。图 1.6 为 SERS 活性纳米球（300nm 直径涂覆有 100nm 银层）的扫描电子显微镜照片。基于纳米粒子的 SERS 技术能敏感检测各种医疗感兴趣的化合物。SERS 纳米探针技术也被纳入多个光纤探针诊断的设计[8]。基于固体表面为基础的技术，SERS 基因探针技术的发展也有报道。一项研究证明，能选择性检测人免疫缺陷病毒 DNA 和癌基因[9]。

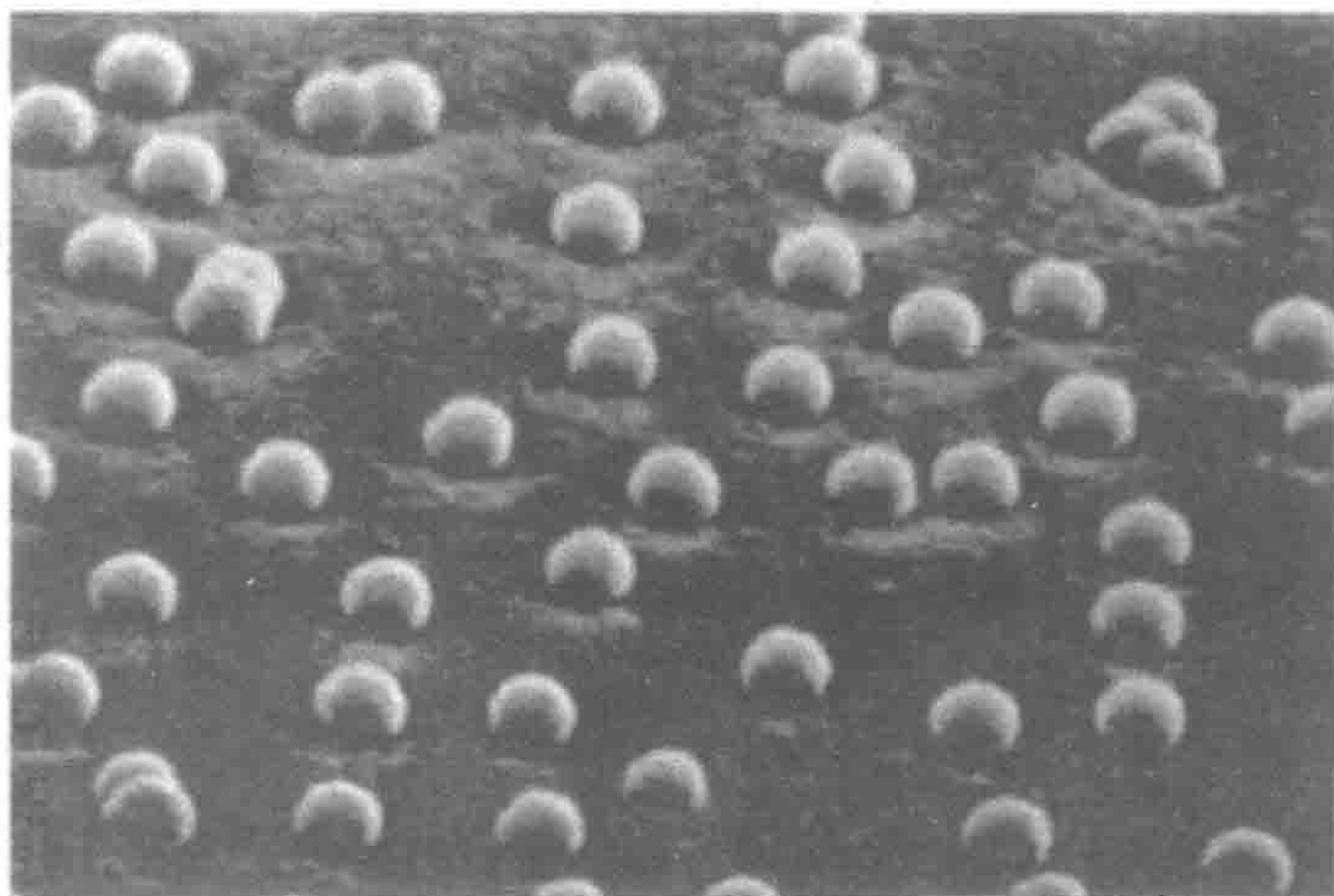


图 1.6　用银纳米壳包埋的纳米球组成的纳米探针

有纳米级维度的光学纳米传感器，已经开发成在活细胞的特定位置探测单个化学物质的仪器[10]。图 1.7 是一个光纤纳米探针与设计的酶底物检测胱天蛋白酶-9 的照片，即单细胞中细胞凋亡期蛋白质的表达[11]。光学感测形态的一个重要优点是，由于纳米探针的极小尺寸使它能够做到非侵害或微创测量生物学参数。根据纳米生物传感器的测定，证明细胞仍然存活并进行有丝分裂[12]。无论是在体内还是体外，生物医学纳米传感器将在未来医学中发挥重要作用。在体内检测超痕量浓度的重要生物分子，是许多先进诊断技术的关键，追踪组织中的痕量生物标志物使其早发现疾病成为可能。

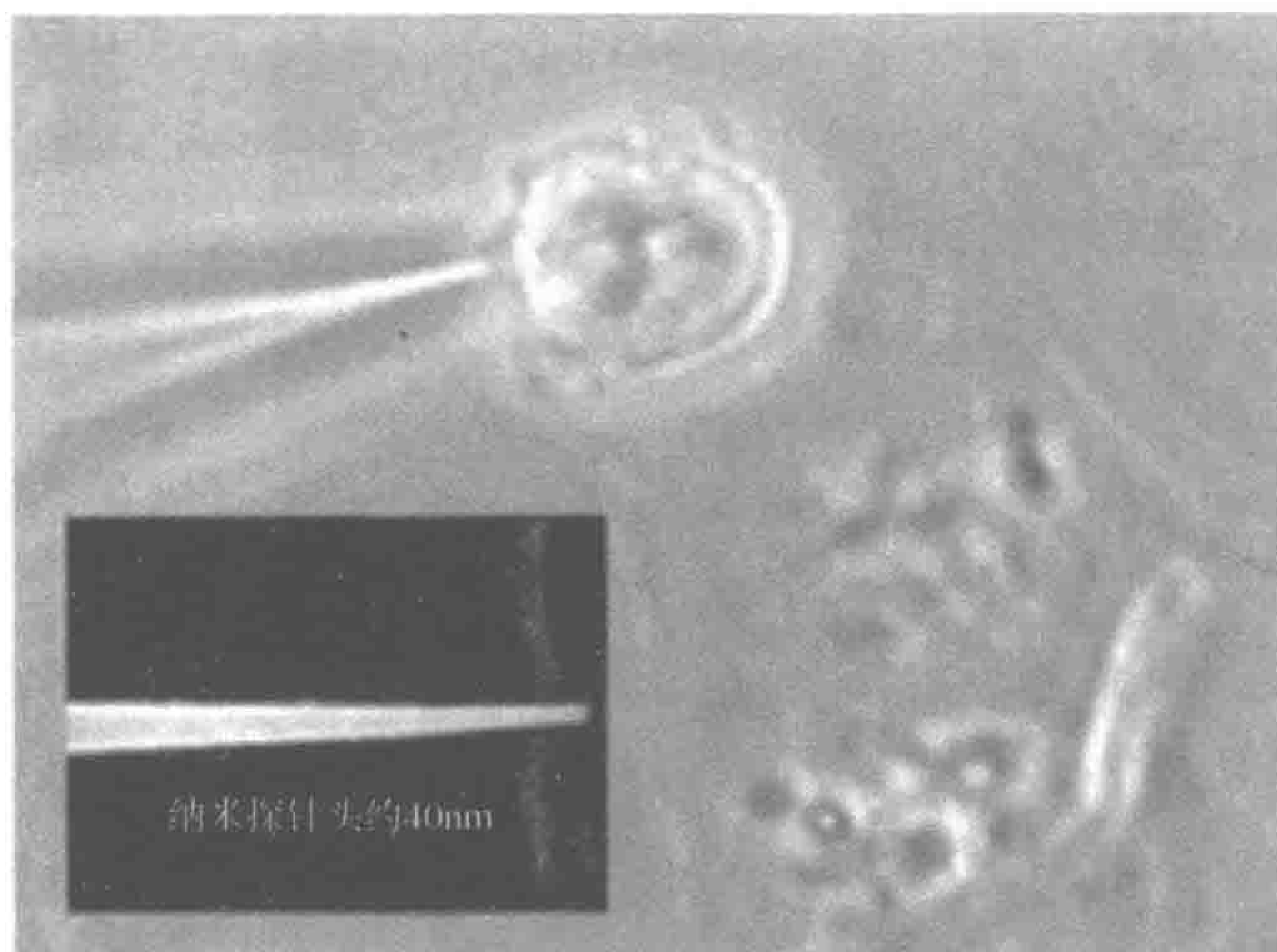


图 1.7 用于单细胞分析的纤维纳米传感器（摘自参考文献[10]）（彩图请扫封底二维码）

基于纳米技术装置和技术的发展，从而在分子水平上测定蛋白质和生物物质的基本参数。用“光学镊”技术，可由高强度聚焦光束在病灶体积中辐射压力捕获小粒子，这种技术也被称为“光学捕获”，导向聚焦束用于移动小细胞或周围亚细胞器[13]。巧妙光学捕获系统也被用来测量单个马达蛋白施加的力[14]。用固定化包埋在小珠中，被关进笼中的生物活性探针被插入到组织甚至细胞中，并用光学捕获系统移动到重要位置。然后通过多光子解笼锁光解，释放和激活生物活性探针。光学镊还用来确定在诊断癌症和衰老过程中的重要成分和关键因子——单分子胶原蛋白的精确机械性能[15]。光学镊方法使用聚焦激光束的动量，以保持和拉伸胶原蛋白分子与聚苯乙烯微珠的键合。用光学激光镊系统使穿过珠粒拉伸胶原蛋白分子，就像用光学显微镜检查微珠的相对移位一样，检测键合胶原蛋白分子的变形。

纳米技术生物学应用的研究，对未来生物研究和医学科学将非常重要。纳米材料在医疗中的应用将彻底改变医疗保健，就像 30 年前材料科学引进心脏瓣膜，尼龙血管和人造关节改变医药一样。先前所讨论的蛋白质纳米技术，刚好是新一代纳米工具的实例，在体内它们有测定、识别和操纵单个蛋白质的潜力，该技术可大大改变我们理解生命过程的理念，它的应用最终导致早期诊断、医疗救治和预防新模式的发展，使作为生命过程构建元件从单个蛋白水平跨越到细胞水平。

参考文献

[1] Feynman, R. (1960) There's plenty of room at the bottom:aninvitationtoentera new field of physics. *Eng. Sci.* February Issue.

[2] Drexler, E. K. (1986) *Engines of Creation*, Anchor Books, New York.

[3] Cosman, M., Lightstone, F. C., Krishnan, V. V., Zeller, L., Prieto, M. C., Roe, D. C and Balhorn, R. (2002) Screening mixtures of small molecules for binding to multiple sites on the surface of tetanus toxin C fragment by bioaffinity NMR. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1218–1228.

[4] Tuzun, R. E., Noid, D. W., and Sumpter, B.G. (1995) The dynamics of molecular bearings. *Nanotechnology* 6, 64–74.

[5] Noid, D. W., Tuzun, R. E., and Sumpter, B. G. (1997) On the importance ofquantum mechanics for nanotechnology. *Nanotechnology* 8, 119–125.

[6] Vo-Dinh, T. (ed.) (2003) *Biomedical Photonics Handbook*, CRC Press, Boca Raton, FL.

[7] Vo-Dinh, T. (1998) Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanostructures. *Trends Anal. Chem.* 17, 557–582.

[8] Isola, N., Stokes, D. L., and Vo-Dinh, T. (1998) Surface-enhanced Raman gene probes for HIV detection. *Anal. Chem.* 70, 1352–1356.

[9] Vo-Dinh, T., Stokes, D. L., Griffin, G. D., Volkan, M., Kim, U. J., and Simon, M. I. (1999) Surface-enhanced Raman scattering (SERS) method and instrumentation for genomics and biomedical analysis. *J. Raman Spectrosc.* 30, 785–793.

[10] Vo-Dinh, T., Alarie, J. P., Cullum, B., and Griffin, G. D. (2000) Antibody based nanoprobe for measurements in a single cell. *Nat. Biotechnol.* 18, 764–767.

[11] Vo-Dinh, T. (2003) Nanosensors: probing the sanctuary of individual living cells. *J. Cell. Biochem.* 39(Suppl.), 154–161.

[12] Vo-Dinh, T., Cullum, B. M., and Stokes, D. L. (2001) Nanosensors and biochips: frontiers in biomolecular diagnostics. *Sens. Actuators B Chem.* 74(1–3), 2–11.

[13] Askin, A., Dziedzic, J. M., and Yamane, T. (1987) Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beam. *Nature* 330, 769–771.

[14] Kojima, H., Muto, E., Higuchi, H., and Yanagido, T. (1997) Mechanics of single kinesin molecules measured by optical trapping nanometry. *Biophys. J.* 73(4), 2012–2022.

[15] Luo, Z. P., Bolander, M. E., and An, K. N. (1997) A method for determination of stiffness of collagen molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232(1), 251–254.

第2章　蛋白质分子水平结晶和机制

Peter G. Vekilov

概　　述

本章以一对铁蛋白/脱铁铁蛋白为例，重点介绍蛋白质分子在过饱和溶液中合并成蛋白质结晶的过程。最常用的研究技术是原子力显微镜。讨论原子力显微镜修饰和获得实时、原位分子分辨率的成像试验。然后，综述建立晶体生长连续模式和分子水平上的离散性之间的对应定量关系。解决分子从溶液进入晶体表面生长部位是否通过艾林型过渡态衰变的慢速率被限制的问题。结论与此相反，Smoluchowski和Debye提出了一个设想方案，遵循动力学，只受到跨越两个分子之间，或新分子与表面之间的相互作用自由能屏障的速率扩散的限制。许多其他蛋白质和纳米蛋白系统的综述认为，这个结论不仅适用于铁蛋白/脱铁铁蛋白的结晶，而且也适合许多其他蛋白质和小分子的结晶系统。最后，将评价结果建立了一种途径，即分子溶液中的以自己的方式掺入到晶体表面结合位点的途径是间接的：它包括表面吸附和二维扩散朝向掺入位点。这些结果可能将有助于在分子水平上理解，不仅对蛋白质和小分子的结晶过程的理解，而且对蛋白质沉积层和衬底上其他柔性物质的沉积及在溶液中自组织的其他过程的理解也有帮助。

关键词：结晶；溶液热力学；原子力显微镜；扩散限制动力学；过渡态；活化能；增长机制；表面扩散；直接掺入

2.1　导　　论

蛋白质结晶与其他相变一样，是通过分子、介观和宏观尺度的组合过程。在溶液相变过程中，分子水平的现象包括改变自由能景观分子之间的相互作用，引起新相的形成与确定相变驱动力；生长过程中分子对新相的附着；分子附着合适位点的形成及瑕疵的产生。在介观尺度，可看作液滴成核现象、聚类或新相的结晶，由毛细管作用控制晶体的新层产生，以及随着晶体表明的繁衍，台阶（steps）之间的相互作用。在宏观尺度，通过界面支配能量和质量的通量（即生长相组分运输和热耗散），以及固体中的压力和张力的平衡和分布，和从弹性至塑性变形的过渡。

在本章中，主要集中于铁蛋白和脱铁铁蛋白的晶体生长期的分子水平过程。铁蛋白是细胞质中[1~3]主要的无血红素铁储存蛋白。蛋白质外层由24个亚基组成，亚基沿菱形十二面体的12个面配对排列[4,5]。铁蛋白作为体内存在的生物矿化的例子被广泛研究[6,7]。铁蛋白含铁的芯可以被其他有机物、无机物和有潜力应用于纳米自组装区域的生物有机化合物、药物递送体、生物矿化物等所替代[8,9]。脱铁铁蛋白是通过酸性溶液溶解而去除铁

素核的蛋白质外壳。来自不同物种的蛋白质结构被认为低于 1.90Å 的分辨率[5]。

有镉离子存在的情况下，铁蛋白和脱铁铁蛋白以立方体 F432 型进行结晶[3,5]。相反，典型的蛋白质结晶有带相同电荷蛋白质之间相互排斥屏障的情况，至于脱铁铁蛋白，镉离子参与分子之间的特异性结合[5]。脱铁铁蛋白结晶这种特异性，创造了其他自组织系统一级近似模型，如病毒、蛋白质复合物和纳米粒子。

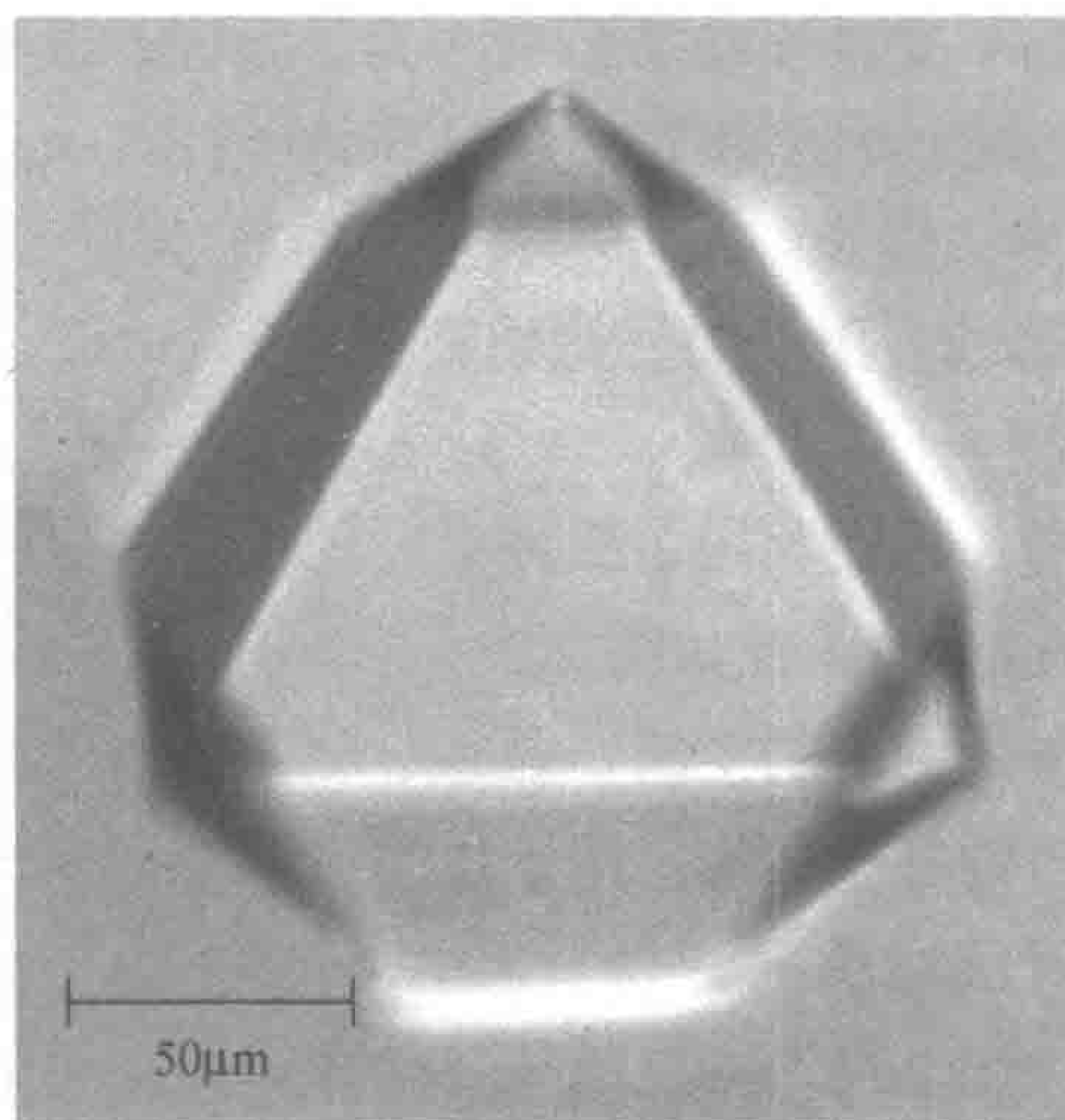


图 2.1 放在小室底部，面朝上的（111）单形脱铁铁蛋白的典型八面体晶体。除颜色外，铁蛋白晶体与红宝石相同

如图 2.1 所示，晶体是由属于对称族的三重轴穿过（111）单形八面体面的多面体。高度对称形的铁蛋白和脱铁铁蛋白分子接近仿真等方形分子形态。此外，结晶分子环境的对称性使得定量分析变得容易获得和理解。由于这两个因素，铁蛋白和脱铁铁蛋白结晶，对热动力学和相变动力学的深入研究是一个特别有吸引力的系统。

在本章中，首先用于分子尺度表征定义生长动力学的方法，然后，讨论离散方法对附着动力学之间对应实验，其中，生长速率和其他空间及生长过程的暂时特征，用统计平均情形来表示，包括单个原子或分子和用物质接近生长界面的通量来评价连续方法。最后，说明分子进入晶体表面生长位点的掺入动力学而不是测定高能量过渡态衰变，但是由于新传入分子周围水化层，仅仅受传入分子越过屏障而扩散的限制。

2.2 方 法

2.2.1 原子力显微镜

在我们实验室，使用 Nanoscope IIIa 或 Nanoscope IV 的多模型原子力显微镜（atomic force microscopy，AFM），配备了 120μm 的扫描仪和 Tapping 模式流式细胞仪。晶体的制备、溶液和细胞装载非常类似于其他大量研究，详细讨论参见参考文献[10]。

实验室温度稳定至（22±0.5）℃。为了控制结晶溶液中的温度，我们将样品安装到佩尔捷冷却盘，牢固地附着在扫描器上。在 28～45℃的范围内成像；探索 25℃和 20℃的结果，室温设定在 18～20℃。流体池温度由嵌入到液滴器下金属盘的热电偶监测，发现在 0.1℃稳定。

使用无干扰探头成像模式[11,12]原位收集晶体生长过程中的所有图像。这使得吸附的蛋白质和杂质种类可视化（在接触成像模式中探头碰撞往往阻止这种成像）。

我们使用标准的 SiN 探头，探头驱动频率是在 25～31kHz，所用特定探针尖头谐振值的范围内进行调整。对其他扫描参数进行调整，使得连续成像既不受表面结构影响，

也不受过程动态影响。为了验证，改变扫描尺度和图像收集的时间，我们既不观察改变过程的时空也不观察时间特性。

2.2.2 原子力显微镜数据

我们利用了三种类型的原子力显微镜（AFM）数据收集。第一类型，包括为 200nm～1mm 的图像如图 2.2 所示，其中 13nm 蛋白质分子清晰可见。显微镜校准，通过测定分子沿密度的空间、晶格包装方向和结晶层顶部的厚度进行验证。如图 2.2 所示，系统之一的各个数据，用于这里的综合研究，脱铁铁蛋白为 13.1Å 和 10.5Å。这些都与晶体 X 射线结构的评价一致。a=18.4nm 为结晶组 F432 的晶格参数[4,5]，分子间的间距为 $(1/2)(2a^2)^{1/2}$=13.0nm，层的厚度为 $(1/3)(3a^2)^{1/2}$=10.6nm。

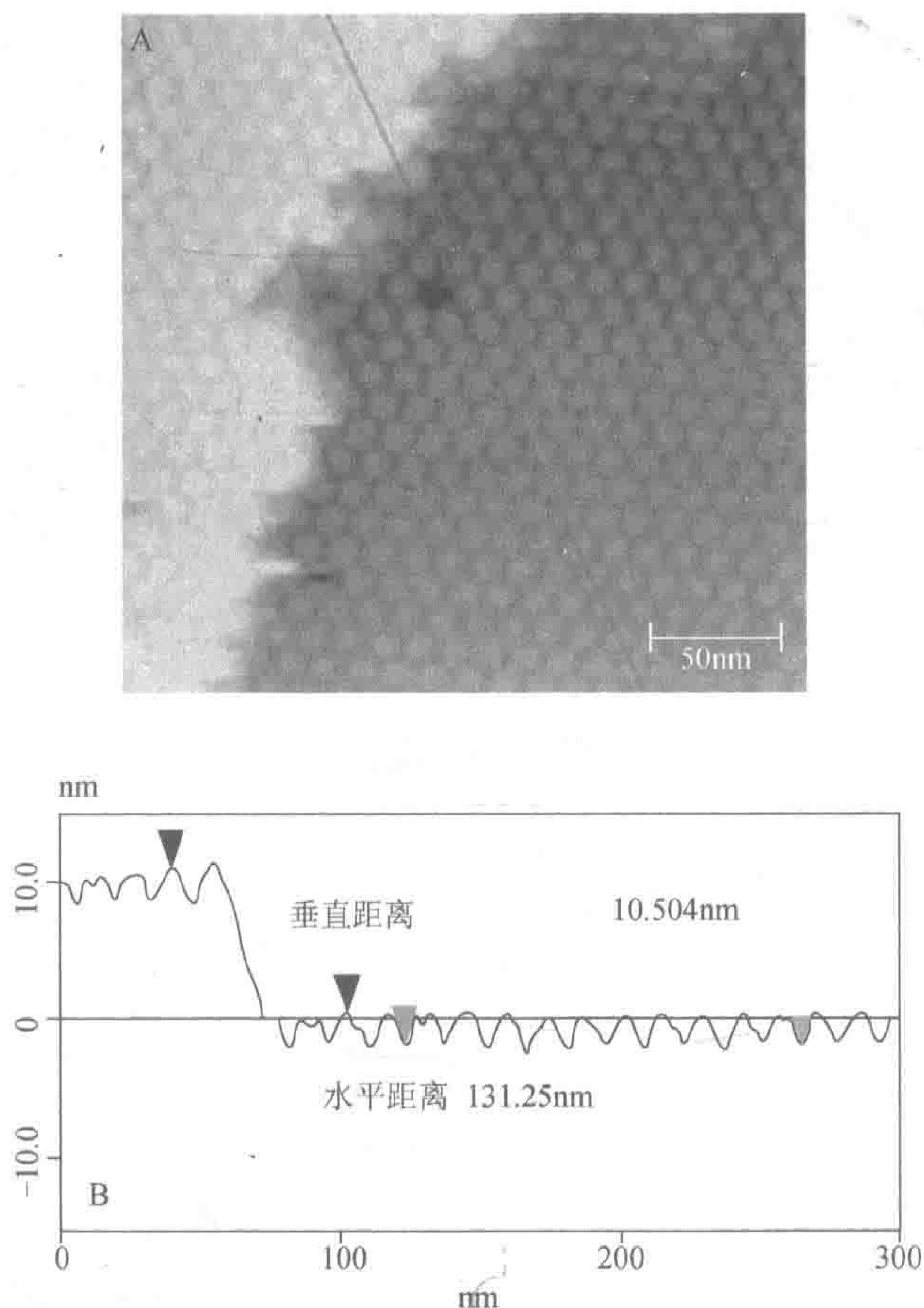


图 2.2　原子力显微镜成像的准确性。(A）脱铁铁蛋白（111）单形晶体面视图；(B）沿（图 A 中）线高度剖面层进行厚度和分子空间的测定结果（摘自参考文献[10]）(彩图请扫封底二维码)

为了评估结晶期间铁蛋白/脱铁铁蛋白的原位分子级成像所能达到的最大分辨率，我们扫描了 200nm×200nm 铁蛋白晶体的表面（图 2.3A)。图 2.3B 二维傅里叶变换图具有

预期的六角形对称，与第一六边形峰和中心之间的距离对应于分辨率等于 13nm 的分子大小一致。从最远的峰来确定最大分辨率是 1.6nm。这种分辨率使我们能够区分图 2.3C 中晶体表面一些亚分子的详细信息。对比图 2.3D [5] X 射线测定分子的结构表明，在图 2.3C 的三角形可能与α-螺旋束一致。

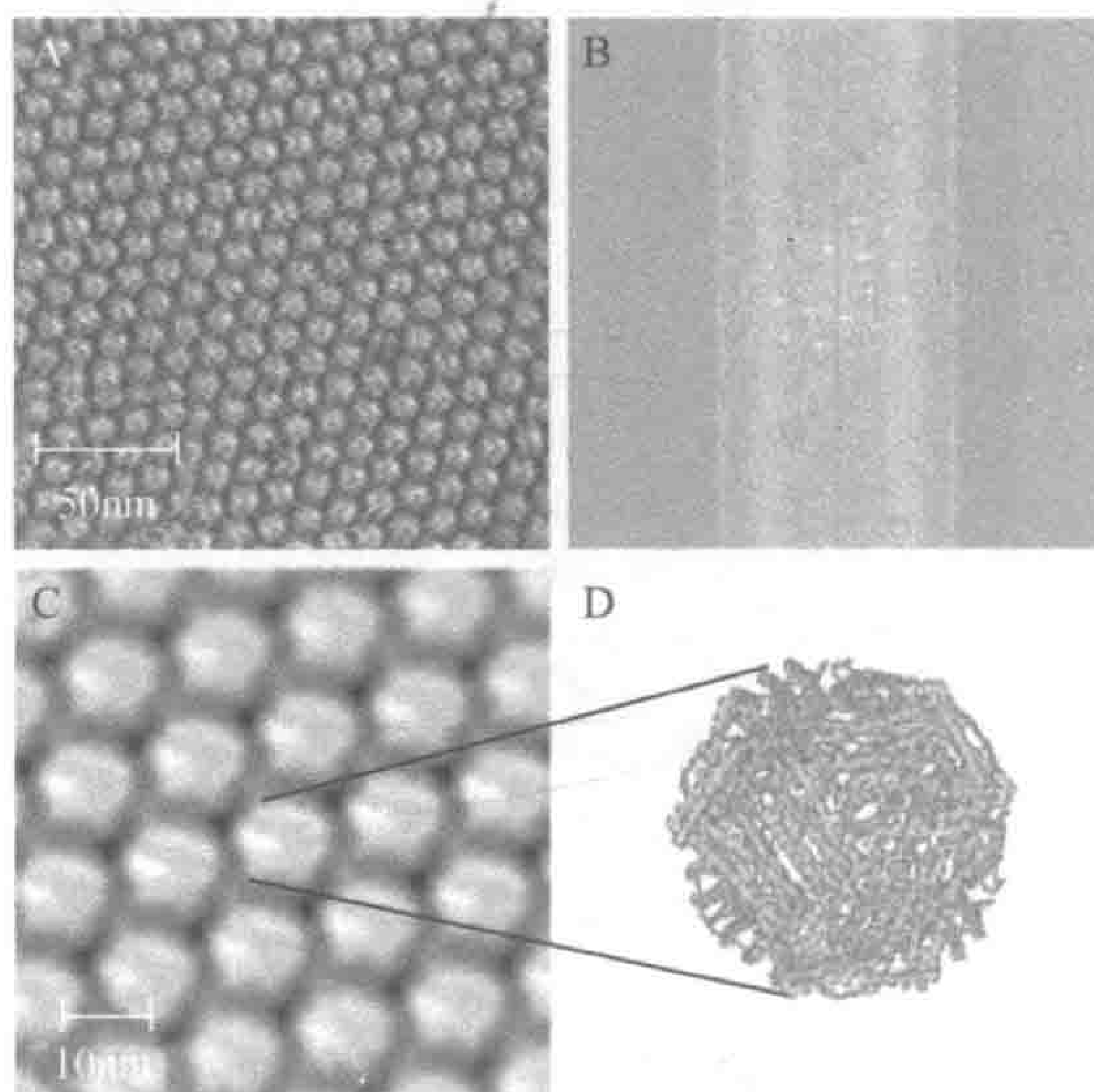


图 2.3　原子力显微镜成像的分辨率。(A) 真实空间的脱铁铁蛋白 (111) 形晶体面的高分辨率图像 (摘自参考文献[10])。(B) 傅里叶变换 A：圆圈高光高分辨率谱峰；第八阶峰顶部和底部的图像相当于约 1.6nm 的分辨率 (摘自参考文献[10])。(C) 实际空间图像中的每个分子被分子框架所代替；SEMPER 软件包对所有分子的平均处理过程 (N. Braun、S. Weinkauf，个人通信)。(D) 缎带表示脱铁铁蛋白分子沿 (111) 方向的 X 射线结构外观。C 中的分子图像有类似三角形的特征

原子力显微镜数据的第二个类型，由从几十纳米到数微米之间的介观尺度图像组成，就像先前原子力显微镜研究溶液中的结晶化一样[13~24]。这些图像类似于在图 2.4 中的一项，2～40μm 视图宽度遵循逐步生长模式的特征。

第三类型的原子力显微镜数据，我们使用无 y 轴扫描[25,26]，就像以前的扫描隧道显微镜（STM）在超高真空条件下，金属和半导体工作一样[27~30]。AFM 探针尖绘制单一晶体表面。在收集到假设图像中，垂直轴代表时间。该技术允许监测几分之一秒的表征时间流程。

如果扫描宽度分别为 600nm 和更小，在结晶台阶上的单个位点的位移，可以用分子分辨率进行监测；也就是说，我们可以从结晶台阶中追踪单分子附着和分离[10,25,31]。数据采集时间通常为 2～3min。紧随扫描，扫描区包括沿着探头尖划过的线。在约 80%的情况下，这些测试证明，探头尖端接触到的位置延迟了生长。丢弃这些数据，这里讨论的是没有探头影响的数据集。

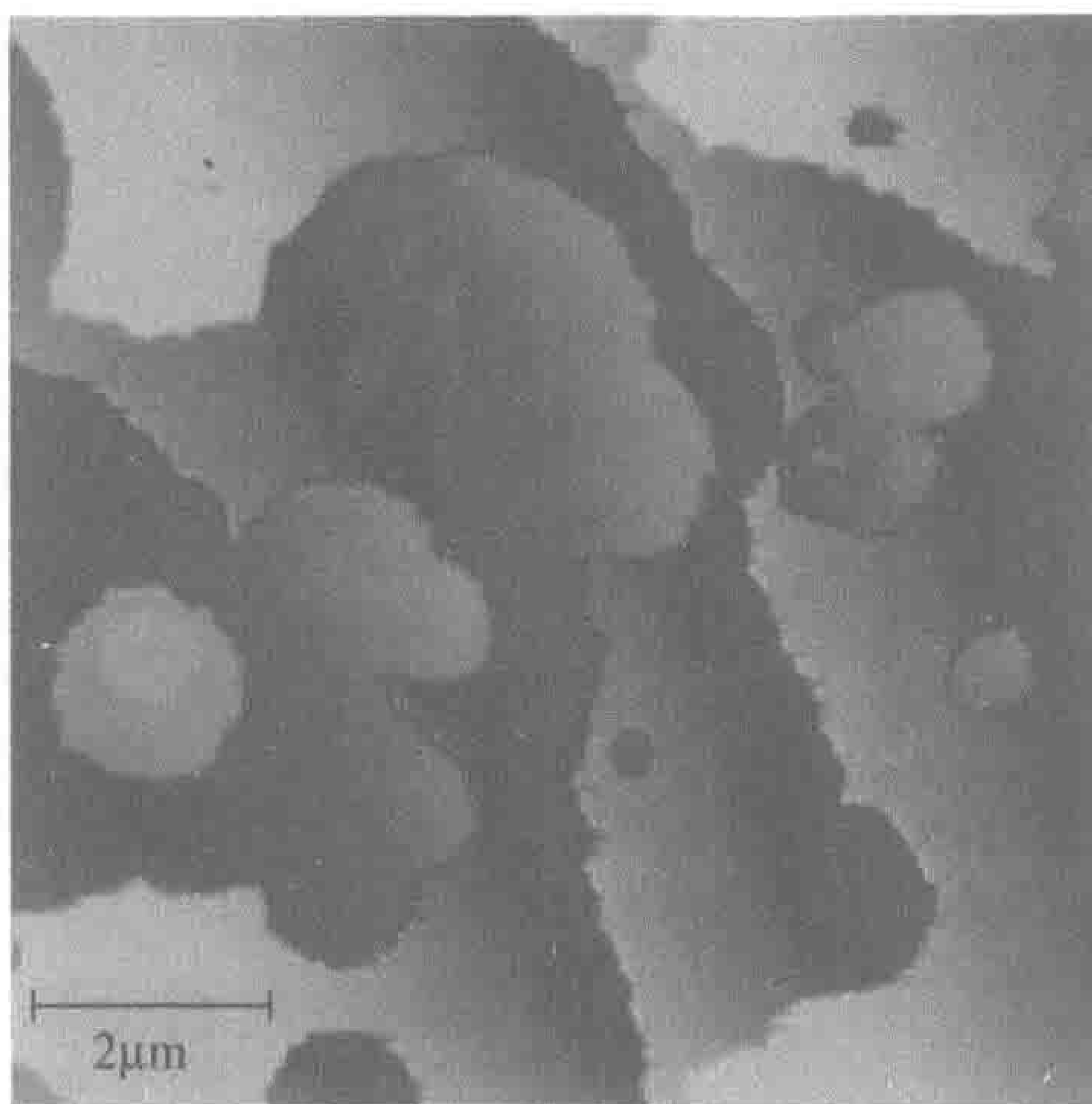


图 2.4　生长中的脱铁铁蛋白晶体表面接近各自小平面中心的原子力显微镜表面图像。小平面大小约 90μm，确保小平面附近均匀过饱和。通过表面晶格核化和与其他“岛屿”合并并覆盖整个小平面的伸展以随机定位产生新结晶层（彩图请扫封底二维码）

2.2.3　台阶速率的测定

结晶生长过程是通过层的产生和扩展，形成新层的生长速率通常称为台阶速度，是主要的动力学变量，它与驱动力结合决定动力学主要参数，即台阶动力学系数。在本研究讨论中，我们采用三种台阶速率测定方法。

第一种方法，我们采用原位原子力显微镜图像分子分辨率发展的台阶程序，如图 2.2 所示。测定的台阶速率为 $Na/\Delta t$ 值，其中，N 是分子质量，a 为两个连续图像 Δt 之间台阶进展的时间。每个铁蛋白或脱铁铁蛋白的浓度，约为所测台阶速率（v）和平均值为 20[32]。这种方法适用于台阶速率小于 5nm/s，在这些条件下，结晶台阶提高几个分子大小，图像采集所需的时间约为 1min[10,25]。

对于高级驱动力台阶数据，我们禁用了 AFM[25]的慢扫描轴。这使我们能够监测 10μm 片段晶体表面生长需要 60～90min，经过频率为 $2\sim4s^{-1}$ 的 15～30 个台阶进行延伸[26]。

为了确保动力学数据的准确性，我们交叉检验了原子力显微镜测定与干扰的结果。这种方法适用于 100nm/s 的台阶速率。我们用激光干扰器从生长晶体表面以 $1s^{-1}$ 频率选择点上变量纪录的时间轨迹，提取了台阶速率平均值。每个点代表约 1000 次测量的平均值[33,34]；根据平均置信区间为 90%评价散射间距数据[32]。在参考文献[34]～[36]中提供有关本方法的完整细节。

2.3　测试系统的表征

2.3.1　分子质量、大小和分子间相互作用

经许多技术测定，脱铁铁蛋白的分子质量为 M_w=450 000g/mol[2,3]，一个分子的质量 m=7.47×10^{-19}g。然而，铁蛋白的平均分子质量在 550 000～950 000g/mol 变化，这取决于铁素体核[2,3]的大小。为了确定这里所用样品中铁蛋白的分子质量，我们在 0.05mol/L $NaOOCCH_3$ 溶液进行静态光散射[37]。用德拜坐标图，$(KC/R_\theta)=[(1/M_w)+2A_2C]$确定分子质量 M_w 和第二渗透位力系数 A_2 二维形式，见图 2.5，其中 R_θ是散射入射光强度的罗利比率；K 是系统常数，$K=(1/N_A)(2\pi n_0/\lambda^2)^2(dn/dC)^2$；$n_0$=1.3320 是溶剂的激光光束的波长下的折射率$\lambda$=0.6328mm[38,39]；$dn/dC$ 为 n 增量与蛋白质浓度 C，每个蛋白质由差示折射计测定以λ=0.628mm，铁蛋白的 dn/dC=0.290cm^3/g，脱铁铁蛋白 dn/dC=0.159cm^3/g。

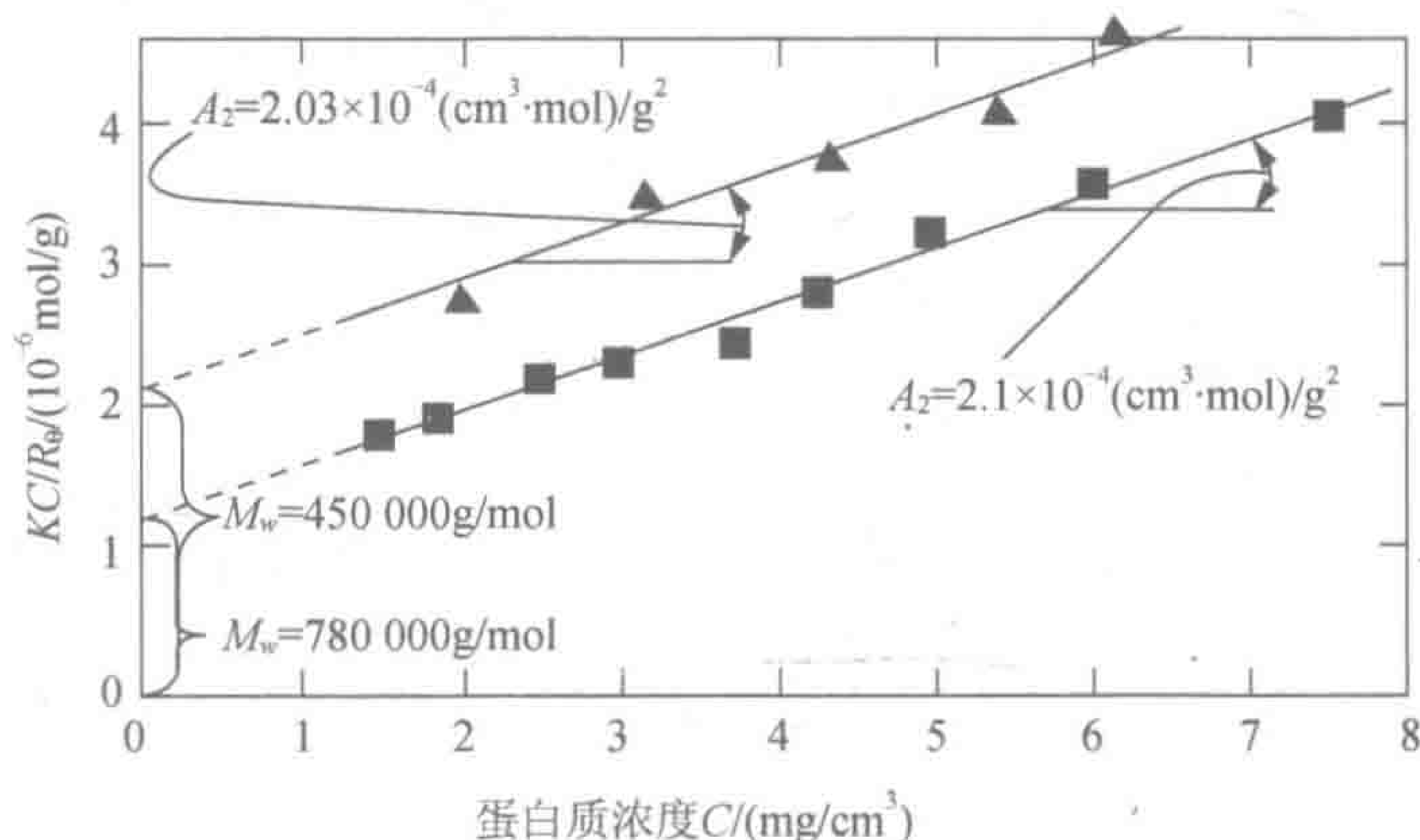


图 2.5　铁蛋白（■）和脱铁铁蛋白（▲）分子在 0.05mol/L $NaOOCCH_3$ 溶液中的静态光散射特性。德拜曲线为（KC/R_θ)=[(1/M_w)+ 2A_2C]（R_θ是激发光强度分散罗利比率，K 是一个系统常数，C 是蛋白质浓度，单位为 mg/ml）。分子质量、M_w 及两种蛋白质在曲线中显示以二维形式的第二渗透位力系数 A_2。蛋白质分子[37,82]之间的排斥力确保了样品不聚集而为分离良好的单体（摘自参考文献[40]）

图 2.5 德拜坐标图显示，对于铁蛋白的 M_w=780 000g/mol，m=1.30×10^{-18}g，并且，正如预期的一样，脱铁铁蛋白的 M_w=450 000g/mol。

图 2.5 也表明第二渗透位力系数值 A_2，两种蛋白质是相似的。这并不奇怪，因为 A_2 表征溶质分子对相互作用，由相同的表面分子决定。

不出所料，动态光散射法测定两种蛋白质产生的[37]散射体大小分布非常窄小，两种蛋白质有相同的直径（13nm）[40]。这等于说它们有相同的晶体直径[2~4]。由于这些大小计算是通过一整套爱因斯坦-斯托克斯布朗运动的实验确定扩散系数法则，平均的晶体学数据表明这两种分子的扩散服从这项定律[41]。

2.3.2　结晶溶解度和驱动力

结晶驱动力写成：

$$\{\exp[-(\mu_c-\mu_s)/k_BT]-1\}\approx(C/C_e-1)=(n/n_e-1) \tag{2.1}$$

其中：

$$\mu_s=\mu_0+k_BT\ln(\gamma C)\text{和}\mu_c=\mu_0+k_BT\ln(\gamma_eC_e) \tag{2.2}$$

在式（2.1）和式（2.2）中，下标 c 和 s 分别表示结晶和溶质；C 和 n 分别是蛋白质质量和分子浓度，$n=C/m$；铁蛋白和脱铁铁蛋白质量 m 的测定，见 2.3.1 节；下标 e 表示它们结晶平衡值。

为了确定铁蛋白和脱铁铁蛋白在 27℃的溶解性，我们监测行列的生长台阶和溶液中脱铁铁蛋白逐渐降低的浓度。我们发现，在一定的 C 时，台阶停止增殖，当浓度降低到低于此值时，台阶运动相反，晶体被溶解。结晶和溶液之间的平衡浓度，铁蛋白 C_e=（35±5）mg/ml，脱铁铁蛋白 C_e=（23±4）mg/ml。

利用除 $NaOOCCH_3$[10]之外含有 Cd^{2+}的非理想溶液的静态光散射表征表明，在 100μg/ml 铁蛋白溶液中活性系数 γ 为 0.996，在相同浓度下脱铁铁蛋白溶液中 γ 为 0.998，这相当接近于蛋白质低浓度单位。

2.3.3　独立分子质量溶解度统计热力学参数

2.3.2 节测定 n_e 值，和参考文献[10]、[25]中的铁蛋白和脱铁铁蛋白分别为(2.7±0.5)×10^{13}cm^{-3}和(3.0±0.5)×10^{13}cm^{-3}。他们在错误限制中相等，提示这些蛋白质的溶解度不依赖于其分子质量。接下来，我提供统计力学参数证据证明这可能是蛋白质分子具有近球形对称的情况。

为了理顺铁蛋白和脱铁铁蛋白明显相等的溶解性，我们考虑溶液与晶体之间的平衡。这是相当于晶体表面上和溶液中纽结分子状态之间的平衡[42~44]。在恒定的温度和压力下，晶体中分子的活动不依赖于溶质的浓度而等于标准晶体状态[45,46]的活动。然后，平衡常数可写成：

$$K_{cryst}=(\gamma_eC_e)^{-1}\approx C_e^{-1} \tag{2.3}$$

式中，γ_e 是蛋白质浓度等于溶解度时蛋白质的活动系数；C_e 是溶解度。活性系数取决于蛋白质浓度和分子间的相互作用。因此，我们期望等浓度的铁蛋白和脱铁铁蛋白溶液 γs 相等。如 2.3.2 节所示，γ 测定，使脱铁铁蛋白溶液浓度比产生 $\gamma\approx1$ 的溶解度升高了 20 倍[10]。我们预期的与铁蛋白一样，这是两种蛋白质在式（2.3）的第二次平衡的基础。

从统计热力学的角度来看，结晶平衡常数 K_{cryst} 可以写成[47]：

$$K_{cryst}=q_0\exp(\mu_0/k_BT) \tag{2.4}$$

式中，q_0 是分子在卷曲中的隔离函数（只有温度和压力函数），μ_0 是分子在溶液中标准化学点位。

为了评估 q_0 和 μ_0，我们假定内部分子在溶液中的振动与在晶体中相同，从其他自由

度解耦。这允许我们忽略这两种状态的内部振动分配函数。此外，我们自己界定溶质分配函数只有平移贡献，忽略旋转的贡献和分子间的相互作用所产生那些堵塞。这就限制了铁蛋白/脱铁铁蛋白对类似分子的补偿效力：具有接近球形对称性和只展现很弱的分子间相互作用，以及活动系数接近于 1。

我们不会顾及过渡期溶剂分子自由能变化的释放或结合。虽然 2.5.2 节中的论据表明这些贡献可能是重要的[10]，但是，我们期望溶剂对铁蛋白与脱铁铁蛋白影响的贡献是一致的。这就是忽略他们的理由，而瞄准两个蛋白质之间的比较。我们也忽略了晶体中的旋转振动。

根据这些假设，我们可以使用分区函数表达式：

$$q_0 = q_x q_y q_z \approx (q_{vib})^3 \tag{2.5}$$

式中，$q_i\,(i{=}x, y, z)$ 是沿着各自坐标平移振动的分区函数。相反，h 为普朗克常数，n 为振动频率，U 为分子在卷曲中潜在的平均力。

$$q_{vib} = \frac{\exp\left(-\dfrac{hv}{k_B T}\right)}{1-\exp\left(-\dfrac{hv}{k_B T}\right)} \approx \frac{k_B T}{hv},\ v = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{f}{m}},\ \text{其中：} f = \left(\frac{\partial^2 U}{\partial i^2}\right)_{\min} \tag{2.6}$$

结合后，我们获得了 q_{vib} 和 q_0：

$$q_{vib} = \frac{2\pi k_B T}{h}\sqrt{\frac{m}{f}},\ q_0 = \left(\frac{2\pi k_B T}{h}\right)^3 \left(\frac{m}{f}\right)^{3/2} \tag{2.7}$$

因为 m_0，所以[47]：

$$\frac{\mu_0}{k_B T} = -\ln\left[\left(\frac{2\pi m k_B T}{h^2}\right)^{3/2} k_B T\right] \text{和} \exp\left(\frac{\mu_0}{k_B T}\right) = \frac{1}{k_B T}\left(\frac{h^2}{2\pi m k_B T}\right)^{3/2} \tag{2.8}$$

我们看到 q_0 包含 $m^{3/2}$，而 $\exp(\mu_0/k_B T)$ 与 $m^{-3/2}$ 成正比；即他们的产物 K_{cryst} 和 C_e 不依赖于分子质量。

2.4 生 长 位 点

2.4.1 纽结和纽结密度

这里使用所有实验条件进行报道，与光学显微镜附加到原子力显微镜所见到的一样，铁蛋白和脱铁铁蛋白结晶有典型的八面体形态与锋利的边缘。所以，在图 2.4、图 2.6～图 2.9 中，原子力显微镜所有图像都表明通过层生成和扩增覆盖整个面进行生长。

脱铁铁蛋白（111）单形面分子结构和生长台阶如图 2.6 所示。台阶纽结是新传入分子附加的位点。纽结附着的分子有一半分子在结晶块中的邻居；铁蛋白和脱铁铁蛋白以面心立方晶格，一半数量等于六，3 个分子属于底层和 3 个分子来自台阶中[42,43,48]。因此，纽结密度是决定晶体掺入溶质分子和生长[49,50]能力的基础变量。

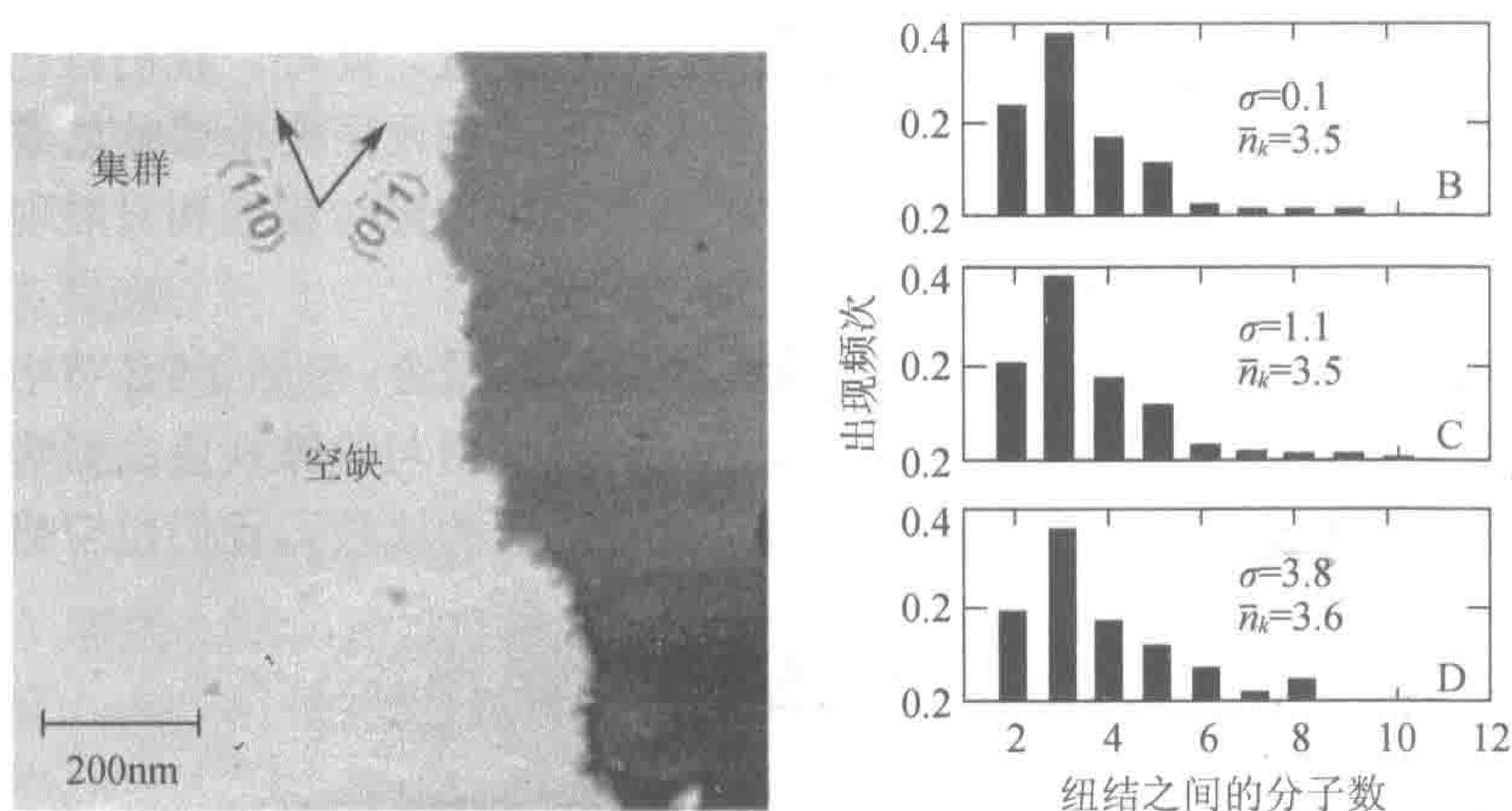


图 2.6　（A）以 70mg/ml 蛋白质浓度的脱铁铁蛋白结晶生长台阶的分子结构，与过饱和一致 $\sigma=\Delta\mu/k_BT=1.1$，（$C/C_e-1$）=2.04。黑暗的区域：低层；光亮区：生长的上层。指出了吸附的杂质集群及表面空缺。（B～D）在位于相距大于 0.5μm 分子之间数目的分布，获得了相似于图 2.1 的图像，在曲线中证明了三个过饱和 *s*。也显示了每种情况下分布的平均值。蛋白质浓度对应于 σ 是 25μg/ml（B）、70μg/ml（C）和 1μg/ml（D）（摘自参考文献[10]）（彩图请扫封底二维码）

从图 2.6 和约 15 个其他类似的图像，我们通过两个纽结之间的分子计数确定纽结密度 n_k，也称为纽结长度[51]，图 2.6B～D 为脱铁铁蛋白、图 2.7B 为铁蛋白分布图。注意纽结密度受表面瑕疵点的影响，如空缺或空缺集群（图 2.6A）及杂质簇吸附在表面[37]。这些特征起堵塞作用：只要八个分子形成连续台阶片段，台阶繁衍就局部延迟[25]。因此，根据图 2.6 和图 2.7 的统计，我们没有考虑台阶片段周围的堵塞作用。我们获得了两种蛋白质 $\bar{n}_k$=3.5。比较图 2.6A～C，我们发现 n_k 分布几乎是同样靠近平衡及非常高的过饱和。

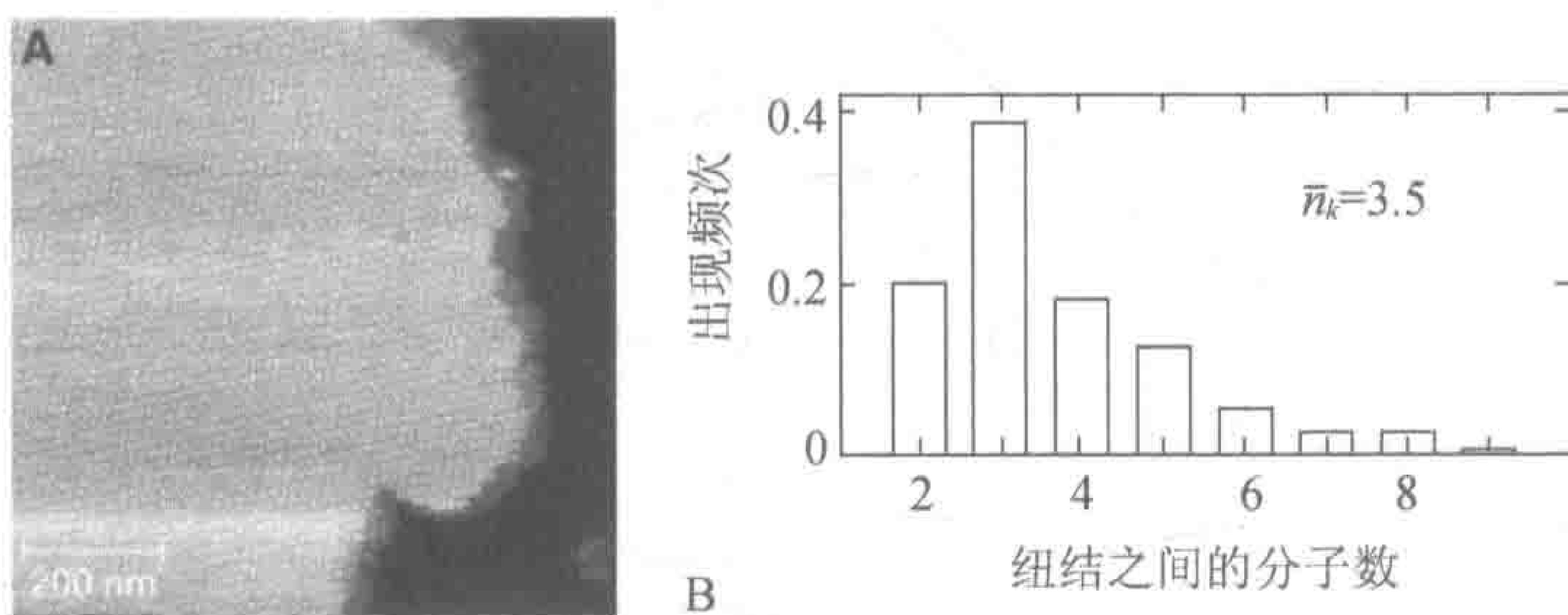


图 2.7　（A）以 70mg/ml 蛋白质浓度的铁蛋白晶体增长步骤的分子结构，相应过饱和度 $\sigma=\Delta\mu/k_BT=0.7$，（$C/C_e-1$）=1。黑暗的区域：低层；浅灰色：生长的上层。（B）位于 0.5mm 间隔的步骤之间的分子分布，获得了类似于（A）相同（C/C_e-1）=1 的图像（摘自参考文献[31]）

2.4.2　纽结的能量和分子相互作用能

热力学过饱和的纽结密度缺乏可靠性表明，纽结不是分子沿着台阶排列的成核现象产生的；这样的结晶核将导致急剧依赖过饱和的纽结密度[52,53]。因此，纽结密度 $1/n_k$ 呈

现的是表面的平衡性质，甚至在过饱和环境下也是如此。在这种情况下，纽结之间分子数量 n_k 是通过分子间相互作用的平衡和结晶顶层的热力学波动单独确定[28,29,54,55]，应该是产生纽结所需能量 w 的函数。推导过程表明[49]，平均 $\bar{n}_k$：

$$\bar{n}_k = \frac{1}{2}\exp(w / k_B T) + 1 \tag{2.9}$$

来自图 2.6 和图 2.7 的值，w=1.6k_BT。$\bar{n}_k$ 非常惊奇的是，这个 w 值只比硅结晶上纽结能量稍低[30]；人们预料硅结晶晶格中强共价键导致显著更高的纽结能量。发现溶菌酶形成的正交晶型 w=7.4k_BT [52]。这种显著高的值导致极低纽结密度，n_k 达 400～800，台阶增长受纽结产生率的限制[52]。

如果假设只有第一邻居的相互作用，我们就可以评估分子内的键能 φ。当一个分子从面心立方晶体面上台阶内移动（111）到台阶位点时，就产生了四个纽结。为此，七个键（顶层中四个和三个来自底层分子）被破坏了，并形成了五个键。然后，$w=\varphi/2$ 和 $\varphi=3.2k_BT \approx$ 7.8kJ/mol=0.09eV。

铁蛋白和脱铁铁蛋白晶体中分子间键，包含每对相邻分子之间有 Asp—Cd^{2+}—Glu 键[4,5]。前面的 φ 值看起来明显低于典型的配位键能。这种低值可能源于 Cd^{2+} 与氨基酸残基配位及与水体（H_2O 和 OH^-）平衡的需要，或由于空间和能量上不利于接触氨基酸残基包括分子间接触。

2.5　结晶热力学和结晶形态

2.5.1　宏观热力学观点

在溶解度温度依赖性的搜索中，根据良好的光学显微镜观察，晶体是在平面小室中生长。在单个的晶体生长变化期，与 20mm 和 400mm 之间的晶体大小一致，温度在 0～40℃变化。符合低溶解度高度过饱和的快速增长速度，没有注意到在此温度范围内高或低的限制。此外，检测到晶体边缘不是圆形，表明由于更高溶解度使晶体溶解了。这些意见将被解释为溶解度没有或很弱的温度依赖性[56]。

不依赖于温度的溶解度意味着结晶的平衡常数也是不依赖于温度的。因此[57]，

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T}\right)_p = -\left(\frac{\partial \Delta G^\circ / RT}{\partial T}\right) = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2} = 0 \tag{2.10}$$

式中，R 是气体常数，或者

$$\left(\frac{\partial \Delta G^\circ}{\partial T}\right) = \frac{\Delta G^\circ}{T} \tag{2.11}$$

式（2.11）有简单的解：

$$\Delta G^\circ = \text{const} \times T \tag{2.12}$$

用$\Delta G°=\Delta H°-T\Delta S°$，获得了$\Delta H°=0$ 和$\Delta S°$=常数。

溶解度温度依赖关系的缺乏会导致以下结论：①结晶焓是零（或极小）；②结晶的熵是独立温度（或弱的温度函数）。

2.5.2　分子过程潜在的焓、熵及结晶自由能

分子间键能 φ 的自由能包含焓和熵的成分。焓值由于离子介导、氢和分子之间其他键，熵成分来源于净释放或结合水和结晶上的其他小分子[45]。为此，我们可以写出结晶自由能的表达式，如下所示：

$$\Delta G° = \Delta H° - T\Delta S°_{溶剂} - T\Delta S°_{蛋白质} \quad (2.13)$$

式中，$\Delta H°-T\Delta S°_{溶剂}$是与 φ 和$\Delta S°_{蛋白质}$相关联的贡献值，是蛋白质分子熵的损失。通过由溶解度到分子间键的自由能 φ 相关值确定的脱铁铁蛋白结晶$\Delta G°$标准自由能的比较，粗略估计$\Delta S°_{蛋白质}$和两种熵贡献的相对权重。

通过脱铁铁蛋白溶解度（23mg/ml）转换为质量摩尔浓度，$C_e=5.2\times10^{-8}$mol/kg。脱铁铁蛋白晶体和溶液之间的平衡为

$$\Delta G = G°(晶体) - \left[G°(溶液) + N_A k_B T \ln(C_e)\right] = 0 \quad (2.14)$$

式中，N_A 是阿伏伽德罗常量，产物 $N_A k_B=R$ 是通用气体常数。因此：

$$\Delta G° = G°(晶体) - G°(溶液) = N_A k_B T \ln C_e \quad (2.15)$$

式中，$\Delta G°=-42$kJ/mol。

为了从 $\varphi=3k_BT\approx7.3$kJ/mol 获得$\Delta H°-T\Delta S°_{溶剂}$，我们必须用 $Z_1/2=6$ 乘 φ，晶体晶格的半数相邻分子（两个分子参与键合，面心立方晶格 $Z_1=12$），用符号解释，我们得到−44kJ/mol。$\Delta H°-T\Delta S°_{溶剂}$与$\Delta G°$贴近度表明结晶自由能$\Delta S°_{蛋白质}$显著。

如上所示，结晶的焓和对溶液中电子相互作用对的相关能量接近于零。在与$\Delta S°_{蛋白质}$组合中，我们得出结论，结晶通常由溶剂的熵最大化所驱动。这种无序能来源于结晶水和其他溶剂成分与溶液中蛋白质分子键合释放的能。相似性可以追溯到构成疏水性的吸引力的过程，其中许多过程由原生态支配[58]，包括蛋白质折叠的某些阶段[59]。

脱铁铁蛋白晶体中的单分子间键形成的标准自由能为−7.8kJ/mol（见 2.4.2 节），完全归因于熵增益引起水的释放，$\Delta S°_{溶剂}=26.6$J/(mol·K)每分子间的键[10]。

这一结论使我们能够粗略地估计两个血红蛋白分子之间的接触的水分子 n_w 释放数目。根据 Tanford[60]第一次提出的类推法，我们比较了血红蛋白结晶的熵效应对冰融化的熵变化=273K，$\Delta S°_{冰}=22$J/(mol·K)[45,61,62]。同样，由于水在晶体中的水化作用的捆绑，产生了 25～29J/(mol·K)[62]，导致熵的损失的评估。用这些数字，$\Delta S°_{溶剂}$值反映了每个分子间键中一个或两个水分子的释放。

这些少量的水分子可以暂时与脱铁铁蛋白面心立方晶体中分子间的键结合。X 射线结构分析显示，每 12 个这类键包含一对 Cd^{2+}[4]。每个成对的 Cd^{2+}周围，2/6 的协调点都

被来自参与键合的脱铁铁蛋白分子天冬氨酸残基和来自其他谷氨酸残基所占用[5]。对应于1个或2个释放的熵变化，而不是4个，水分子的事实指出，Cd^{2+}可能会与传入的脱铁铁蛋白分子或已经在晶体中的脱铁铁蛋白分子预先结合。

因此，如铁蛋白和脱铁铁蛋白晶体结构提示的那样[3~5]，结晶驱动力的主要成分来源于每对分子之间 Cd^{2+}介导的牢固的键。我们的意外结论是这个驱动力不是起源于焓（这样键可能的大的负焓必然已经得到了其他分子修补程序不利焓效应的补偿），而是来自形成这个键过程中水释放的熵。

2.6 生长分子水平动力学

虽然纽结密度是一种可变的热力学生长，即晶体对溶质分子的亲和特性，掺入动力学反映了分子进入生长点的不稳定状态。为了监测这些快速掺入情形，我们放弃了原子力显微镜的慢扫描轴。台阶位点的增长显示于图2.8和图2.9。根据图2.8和图2.9中跟踪扫描区域揭示，不会抑制台阶运动或加速了定位扫描；也就是说，选择的扫描参数确保3min内扫描样品不会影响台阶增长。

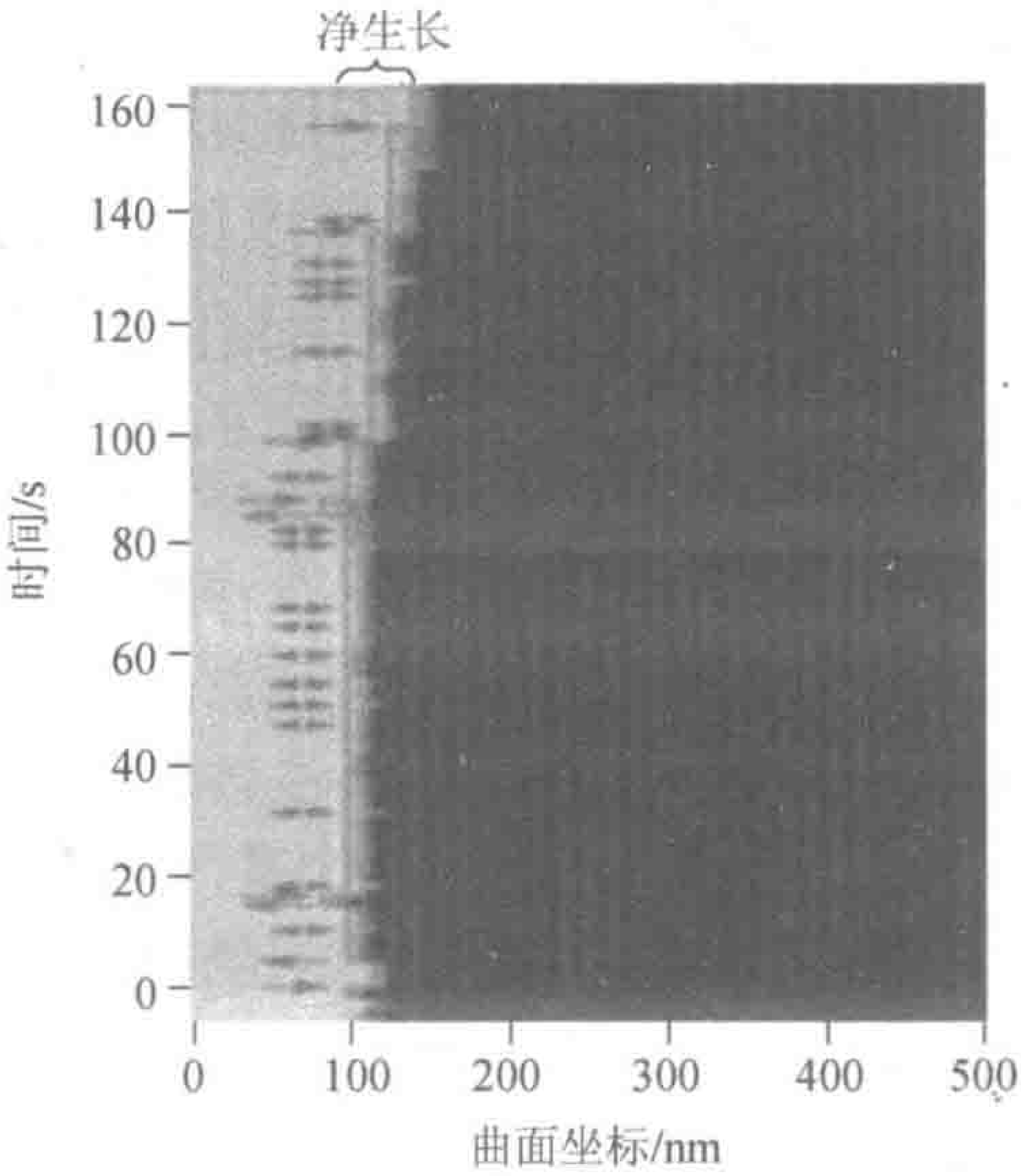


图2.8 70mg/ml浓度的脱铁铁蛋白分子掺入步骤为：σ=1.1版和（C/C_e−1）=2.04。Pseudoimage记录用3Hz与y扫描轴扫描频率在时间等于0的假象记录显示生长位点的位移。生长位点的跟踪。红色箭头表示停留时间大于1s的附着和分离情况，蓝色双面箭头表示停留时间小于1s；详细内容请看文本。时间大于80s 1/2分子的附着显示深绿色，是由于扫描仪漂移输入图像邻近位点（摘自参考文献[10]）

（彩图请扫封底二维码）

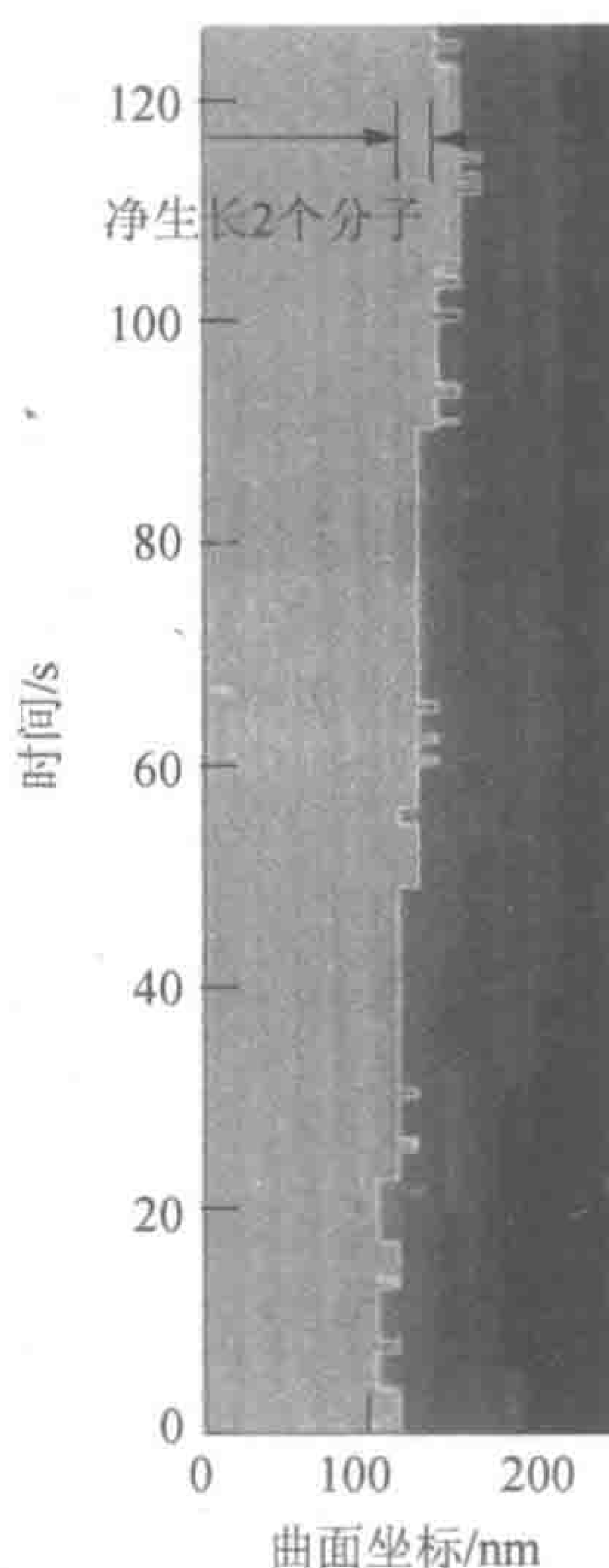


图 2.9　在蛋白质浓度为 70mg/ml 时，分子掺入到铁蛋白晶体的台阶中，与过饱和 $\sigma=\Delta\mu/k_BT=0.7$，$C/C_e-1$）=1 相一致。时间等于 0 时，扫描轴与瑕疵台阶平行记录的假设图，证明了台阶中的一个分子位点的位移。在此成像模式下，上层分子和下层分子显示为垂直柱形。红色轮廓跟踪台阶的位置。左边轮廓表示分子从监控的位点脱离，而右边表示分子附着到监控位点（摘自参考文献[31]）

尽管相对高的溶液过饱和度 $\sigma=1.1$，图 2.8 中的时间跟踪显示不仅达到 25 个分子，而且还有 22 个分子从监控位点离开。所有抵达和离开的分子，从监控的位点都涉及单分子。因此，与形成多分子生长单位的主张相反，溶菌酶、脱铁铁蛋白、铁蛋白的晶体生长都由单分子附着[63~65]。

这种数据类型的收集不可能观察到台阶的邻近位点。因此，我们无法区分来自于纽结或台阶分子的附着和分离。尽管如此，我们仍然注意到这些事件之间停留时间 t 之间下降 $t\leqslant 1$s，或下降 $t>5$s。图 2.8 显示第二类型 6 个事件和第一类型的 19 个事件。他们的比例大约相等于沿着台阶的纽结密度，提示长时间事件可能是纽结的附着和分离，短暂事件可以看到台阶边缘的分子。

此外，分子可能进入观察线内，由于分子沿着台阶扩散，或台阶之间的台地（terrace）或相邻溶液之间交换。后者导致台阶的增加与生长，前者是只涉及已经属于晶体分子重排的过程，可能与生长无关。为了区分这两者，像以前在金属和半导体表面[28,54,66~68]形成台阶那样，我们计算了台阶位点 x（分子大小单位）的时间相关函数，如$\langle[x(t+\Delta t)-x(t)]^2\rangle_{\Delta t}$，与各自$\Delta t$ 的平均值。如图 2.10 所示，它被绘制为Δt 的函数。台阶与平衡介质的交换理论分析预测[28,54,68~70]，如果沿台阶边缘扩散促进台阶位点占主导地位，那么 $\Delta t^{1/4}$ 依赖性就互相关[28,54,68~70]。我们没有发现处理过饱和条件的理论。然而，台阶边缘上的位点运动类似于布朗运动[68,69]。对布朗扩散来说，相关系数$\langle[x(t+\Delta t)-x(t)]^2\rangle_{\Delta t}$ 和$\Delta t^{1/2}$

可能会有所不同，但指数的Δt 的 1/2 并不取决于浓度或化学点位梯度的存在或缺失[57]。因此，我们使用唯一的Δt 指数源自图 2.10 中的数据进行进一步讨论。

图 2.10 中的数据并不适合单一指数。以长于 20s 的时间偏差 1/4，使我们得出结论，在图 2.8 中的跟踪可能反映了台阶和台阶间台地或相邻溶液之间分子的交换。这一结论使我们能够从图 2.8 和图 2.9 分子附着到纽结中提取净频率。因为脱铁铁蛋白（C/C_e-1）=2，从三个分子净附着 162s 和查看 $1/n_k=1/3.5$ 纠结的概率，我们获得了$(j_+-j_-)=0.065\text{s}^{-1}$，即每 15s 左右一个分子。铁蛋白（$C/C_e-1$）=1，图 2.9 显示两个分子 128s 的净生长量，导致平均净通量$(j_+-j_-)=0.054\text{s}^{-1}$ 进入生长点，以中间密度=0.28 分布。因此，即使在图 2.8 和图 2.9 相对较高的过饱和的情况下，分子掺入到结晶中仍然极其缓慢和超越了宏观时间尺度。

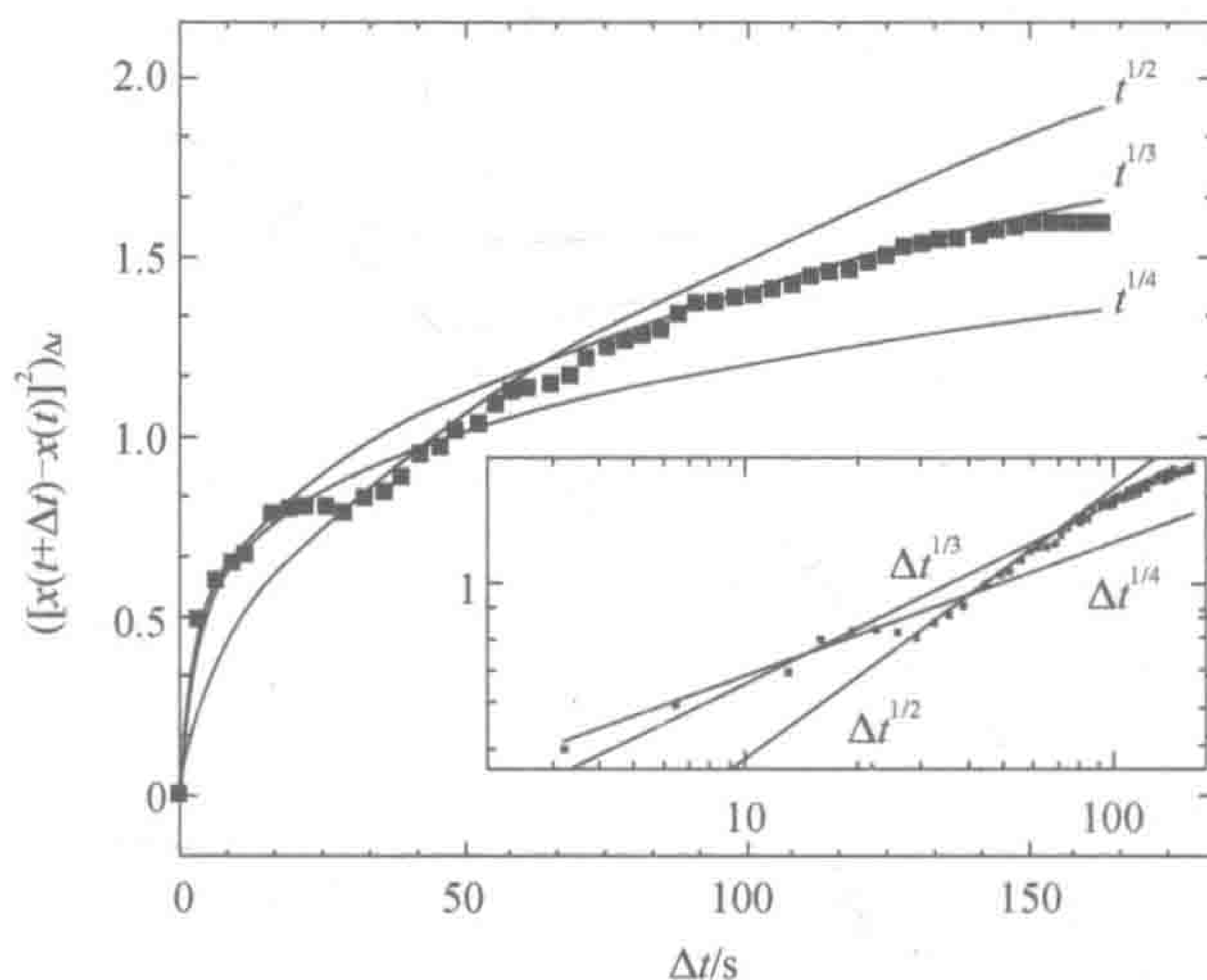


图 2.10　对时间间隔Δt 作为这个Δt 的函数，时间相关曲线，中间方块表示台阶位置中的移位，跟踪与图 2.8 中台阶位置相一致；插图：对数曲线。实心正方形表示数据；线条符合依赖时间指数以点表示（摘自参考文献[25]）

图 2.11 显示采用 2.2.3 节中的 3 种方法，测定两种蛋白质的台阶速率 v。数据适合良好的均衡性：

$$v=\beta\Omega C_e(C/C_e-1)=\beta\Omega n_e(n/n_e-1) \tag{2.16}$$

$\Omega=1/4a^3=1.56\times10^{-18}\text{cm}^3$——每个铁蛋白或脱铁铁蛋白分子晶体体积，和铁蛋白台阶动力学系数β[50,71]是$(6.0\pm0.4)\times10^{-4}$cm/s，脱铁铁蛋白为$(6.0\pm0.3)\times10^{-4}$cm/s。

由于台阶而不是附着位点上的分子没有来源和分子沉淀，台阶生长速率 v 应该等于 $a\bar{n}_k^{-1}(j_+-\dot{j_-})$[50,72]。$At(C/C_e-1)=1$，收集图 2.9 中铁蛋白的所有数据，图 2.11 的铁蛋白台阶生长率值为 v=0.20nm/s，等于产物 $a\bar{n}_k^{-1}(j_+-j_-)$脱铁铁蛋白平均台阶速率（C/C_e-1）=2，$\sigma=1.1$是 v=0.26nm/s。测定产物 $a\bar{n}_k^{-1}(j_+-j_-)$以同样的条件是 0.24nm/s。

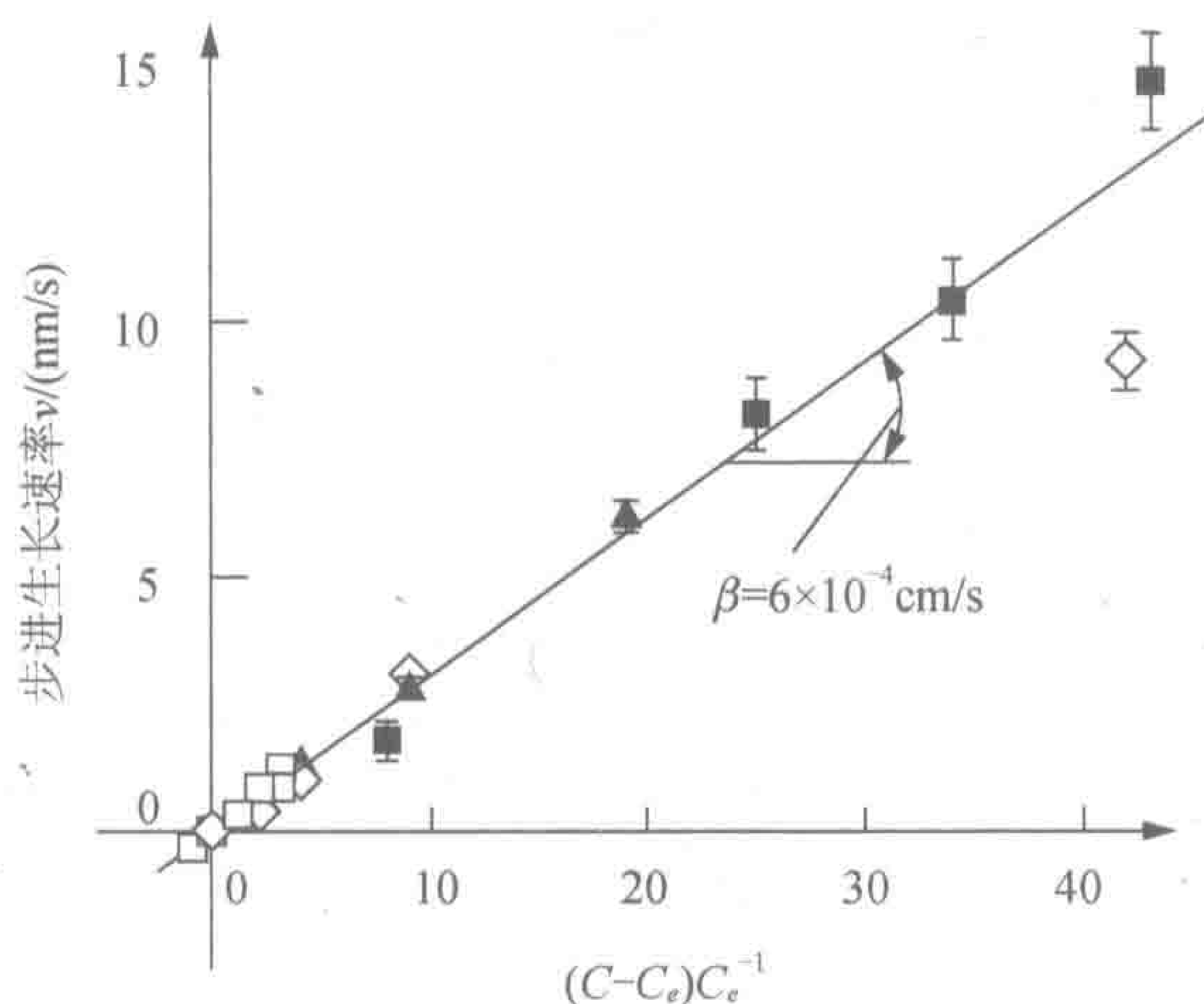


图 2.11　铁蛋白和脱铁铁蛋白台阶生长动力学系数的测定。结晶驱动力（C/C_e-1）。（□，◇）生长速率 v 的依赖关系，v 值，分别为来自前进中的台阶原位 AFM 图像中分子分辨率顺序的铁蛋白和脱铁铁蛋白。（C/C_e-1）=42 脱铁铁蛋白点的低值的原因不很清楚。这个点不用于动力学系数β的测定。（▲）从不用 y 轴扫描中提取的脱铁铁蛋白数据。（■）用激光干涉法测定的步进生长速率的时间跟踪数据。直线对应于步进动力学系数β=6×10^{-4}cm/s（摘自参考文献[40]）

产物 $a\bar{n}_k^{-1}(j_+ - j_-)$ 近似值和 vs 测定表明，分子沿着台阶掺入纽结只出现在铁蛋白结晶的台阶生长时[10,25]。

2.7　是什么限制分子在纽结中掺入速率？

2.7.1　扩散限制动力学或过渡态动力学

接下来，要讨论在掺入到固定在纽结前面的分子纽结生长机制中，确定最后阶段即化学阶段的速率因素。以这种方式，排除了溶液聚集到纽结的分子供给速率的考虑，构建了输送阶段生长机制。

溶液中化学反应的动力学仅仅受到物质扩散速率的限制[73]或者外加高能量过渡态的减慢[74]。前者动力学途径并不排除潜在自由能障碍的存在。已经表明，如果分子必须克服最大排斥力而达到结合最小值，结合速率可以评价为越过屏障的扩散。所得动力学规律包含屏障[74]高度的指数依赖性。

溶液中相变动力学，人们普遍认为胶体颗粒遵循扩散限制模式，而新阶段小分子的生长速率被认为是由一个过渡状态的约束[71,72,75~77]。蛋白质固相的中间体状态，其生长动力学很大程度上类似于小分子的状态，并且认为适用过渡态规律[78]。虽然速率规律让人想起扩散限制机制已经被假定为小分子相的过渡[49,79,80]，它们被视为等同于相应的过渡态表达式[79,80]，但并没有关键测试来区分这两种机制之间建议或执行。

在过渡态动力学中，速率系数是①取决于质量[50,81]；②不依赖于扩散率[74]；③因为

过渡态熵的原因有更快的高对称性分子[72]。接下来将要讨论的证据表明：第一阻碍了铁蛋白/脱铁铁蛋白对，第二和第三阻碍了许多其他系统，提示许多相变的速率实际上是扩散限制的。

图2.11中的数据表明，在同等驱动力的情况下，两种蛋白质台阶生长速率相等。因为在前面的小节中我们已经证明，分子纽结附着的机制对两种蛋白质都相同，我们认为这个观察结果是与过渡态类型动力学规律相矛盾，其中，过渡态分配函数的振动成分导致β到 $m^{-1/2}$ 的均衡，第一号过渡态动力学特征刚才讨论过了。我们的结论是，掺入到纽结的动力学只受扩散的限制[40]。

2.7.2　有限扩散动力学情况下分子掺入纽结的通量评价

我们从溶液中结晶生长动态系数作为越过能量壁垒 U 扩散的表达式，随后是畅通的掺入[73,74]。壁垒 U 可能是静电源头[74]；然而，对于铁蛋白/脱铁铁蛋白对来说，它可能需要清除附着到传入分子和生长部位上的水分子[82]。由于水疏水和亲水表面结构而产生很强和很大范围的排斥位能[83,84]。

图2.12示意介绍了位能的清除。位能以增加分支交叉达到其最大值 U_{max}，由于传入溶质分子和晶体表面在介质分离之间的排斥力并减弱了分支，这相当于分子应该进入生长部位所需的短程引力。我们把坐标轴 x=0 的开始以最大值来定位。我们分配有限曲率 $U(x)$为最大和链接最后几个溶剂分子的排斥作为加入晶体的传入溶质分子。假定有限曲率遵循先前溶液有类似的问题[85,86]。距离 d 用作上层限制，通过溶质分子与表面的相互作用的范围与下层结合，它可以是少量溶质分子，并从上方通过在溶液中聚集的溶质分子间 $n^{-1/3}\approx$0.2mm 的距离。因此，选择 d 可以显著长于分子大小和纽结长度，并使用一维模型是有道理的。由于越过陡峭屏障的扩散速率不仅取决于曲率周围的最大值[85,86]，而且选择 d 不影响结果。

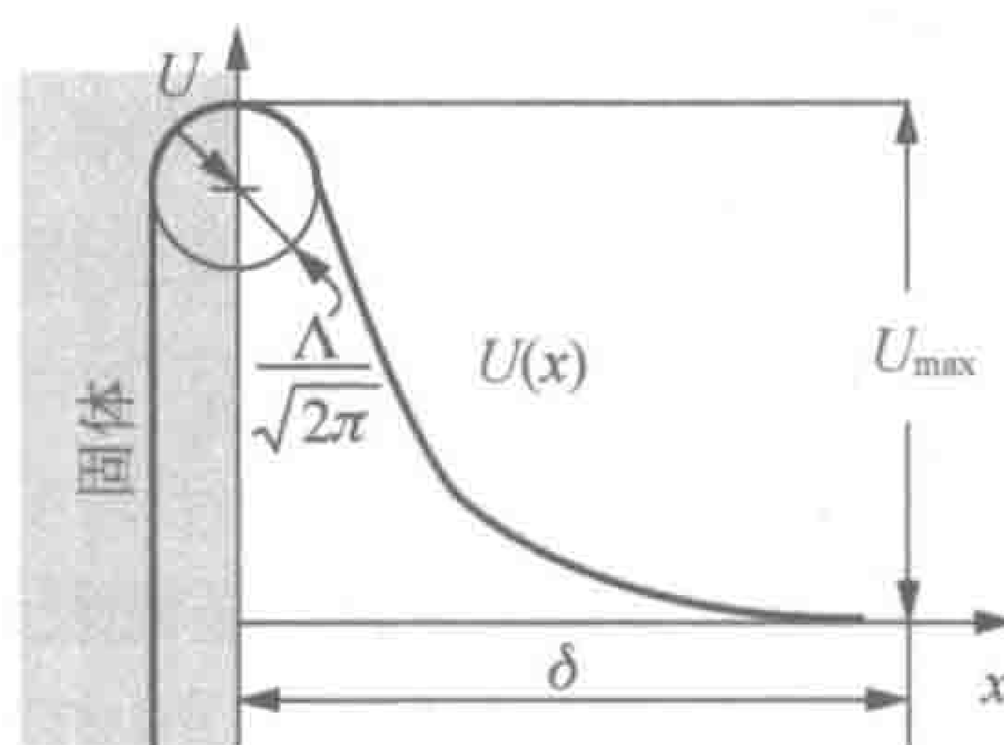


图2.12　在生长界面前清除势能的示意图。有关详细信息请参阅文本（摘自参考文献[40]）

为了计算分子通量 J 与浓度 n，由浓度梯度驱动，克服到达表面的障碍，我们定向坐标 x 垂直于生长面和令位能消除接近表面 $U(x)$。从广义菲克定律来说，$J=(nD/k_BT)d\mu/dx$，$\mu(T,x)=\mu_0(T)+k_BT\ln[\gamma n(x)]+U(x)$和 $\gamma\approx 1$[10]，J 与 $U(x)$、$n(x)$和 n 梯度连接[73,86]：

$$J = D\left\{\frac{dn(x)}{dx} + n(x)\frac{d\left[U(x)/k_BT\right]}{dx}\right\}, x>0 \tag{2.17}$$

式中，D 是分子的斯托克斯扩散系数。在寻找稳定的 J=常数时，我们整合了式（2.17）。具有两组边界条件：①在从表面 δ，$x\geqslant\delta$，U=0，$n=n_\delta$ 一定距离中；②晶体，即在 $x\leqslant 0$ 中，n=0。

除以 D，用 $\exp[U(x)/k_BT]$乘以双边，得

$$\frac{J}{D}\exp\left[U(x)/k_BT\right]=\frac{d}{dx}\left\{n(x)\exp\left[U(x)/k_BT\right]\right\} \tag{2.18}$$

用界定条件 x=0 和 $x\geqslant\delta$，从 x=0 到 $x=\delta$ 整理得

$$J=\frac{n_\delta D}{\int_0^\delta \exp\left[U(x)/k_BT\right]dx} \tag{2.19}$$

模拟参考文献[74]式（9.51）和通过 $U(x)$颗粒的相互作用凝集物的富克斯表达式。

如果在 x=0 时 $U(x)$出现突然最大，我们就可以用最大的点周围的对称函数来表示。如式（2.20）所示，在许多情况下，$|d^2U/dx^2|<a$，这证明突然最大的假设。我们首先只用泰勒级数的两个成员：$U(x)=U_{\max}-1/2|d^2U/dx^2|x^2$。减号源于 $d^2U/dx^2<0$ 时的最大值。然后，将积分

$$\int_0^\delta \exp\left[U(x)/k_BT\right]dx\approx\exp\left(\frac{U_{\max}}{k_BT}\right)\left[\frac{2}{\pi}\left|\frac{\partial^2(U/k_BT)}{\partial x^2}\right|_{x=0}\right]^{-1/2} \tag{2.20}$$

接近式（2.20）是基于 $\delta\gg[1/2|d^2U/dx^2|]^{-1/2}$ 为式（2.20）中高斯系数，最终：

$$J=D\sqrt{\frac{2}{\pi k_BT}}\left\{\left|\frac{\partial^2U}{\partial x^2}\right|_{\max}\right\}^{1/2}\exp\left(-\frac{U_{\max}}{k_BT}\right)n_\delta \tag{2.21}$$

注意，来自式（2.21）的通量 J 只有一半贡献于增长：在屏障的顶部，力驱动分子进入结晶为零，分子有相等掺入机会，或者返回到溶液中[87]。与此，在其最大时，引入参数 L 作为 $U(x)/k_BT$ 的曲率半径：

$$\Lambda=\left(\frac{1}{2\pi}\left|\frac{\partial^2(U/k_BT)}{\partial x^2}\right|_{\max}\right)^{-1/2} \tag{2.22}$$

J 变成表达式：

$$J=\frac{D}{\Lambda}\exp\left(-\frac{U_{\max}}{k_BT}\right)n_\delta \tag{2.23}$$

式（2.23）基本上与泽利多维奇衍生晶体成核速率表达式相同[86]，在聚类空间中作为超越位能壁垒扩散通量。

如果 $U_{\max}$ 是由于传入分子的水合作用和它附着的部位，$U_{\max}$ 周围曲率半径 $U(x)$应该是几个水分子的大小，即 2～4Å，长度 Λ 应为 5～10Å。请注意，在本次评价中，我们考虑应用离散数学的连续模型。尽管如此，我们预计 Λ 的估计是大致正确的。

如果所有分子能够克服障碍掺入到纽结中，则进入通量到成纽结应为 $j_+=JDS_{\text{kink}}\approx Ja^2$，其中 a^2 为纽结的有效表面积。如果没有溶质运移系统规定函数（动态增长机制），那么，n_d 等于溶液体积 n。此外，平衡时，当 n 等于溶解度时，n_e，$j_+=j_-$。由于 j_-不依赖于溶液中 n，台阶速率 v 是

$$v = \frac{a}{\bar{n}_k}(j_+ - j_-) = \frac{a^3}{\bar{n}_k}\frac{D}{\Lambda}\exp\left(-\frac{U_{\max}}{k_B T}\right)(n - n_e) \tag{2.24}$$

由于布朗扩散不依赖于分子质量，上述模型产生了大量无关的动态摩擦系数（详见补充资料）。由此产生台阶生长速度 v 是

$$v = \frac{a}{\bar{n}_k}(j_+ - j_-) = \frac{a^3}{\bar{n}_k}\frac{D}{\Lambda}\exp\left(-\frac{U_{\max}}{k_B T}\right)(n - n_e) \tag{2.25}$$

式中，L 含有围绕最大值 $U(x)$的曲率半径，因此，少量水分子可能为 5～10Å 的大小。

随着 $a^3=W$，在容易比较实验数据典型式（2.16）中，我们重写式（2.25）[40]。定义 β为

$$\beta = \frac{1}{\bar{n}_k}\frac{D}{\Lambda}\exp\left(-\frac{U_{\max}}{k_B T}\right) \tag{2.26}$$

在式（2.26）中，参数 $\bar{n}_k$、D、Λ 和 $U_{\max}$ 具有明确的物理含义，并且可以独立地测量[40]。

2.7.3　按照有限扩散动力学规律如何明确分子类型？

用 L 定义为构件、原子或溶解分子的“自由路径”，$D/\Lambda\bar{n}_k$ 值已经用于结晶溶解的动态系数。在进一步的工作中，该规律显示，很难预测金属凝固的行为 $D/\Lambda\bar{n}_k$[89]。注意，与式（2.26）形成明显对比的是用溶质分子的爱因斯坦-斯托克斯扩散来处理晶体的生长。

在传统的论文中[49]，扩散率到纽结之间的平均距离为动态系数。后来无数的实验证明这个定义缺失生长能量壁垒[81]。在进一步的进展中[79]，台阶运动的动态系数假定为 $\beta=(D/\Lambda)\exp(-U/k_BT)$，用 Λ 导入作为溶液中“水跃跃长”。用式（2.26）与这个公式比较，我们看到 $\bar{n}_k^{-1}$ 式（2.26）明确占平均纽结密度和提供了 Λ 的明确定义。

从凝胶中蛋白质晶体生长实验可以发现在其他溶液系统中扩散限制动力学证据，其中蛋白质扩散系数比在“无（free）”溶液中显著降低。人们发现生长速率最大值的两个蛋白质，即在溶液耗竭和传输控制开始之前的生长早期的记录，比在无溶液中等值低 6.6/10～3/10[90]。这表明，生长动力学系数与扩散率相关。在用溶菌酶蛋白实验的另一项工作中，人们发现，在胶体介质中，生长界面蛋白质浓度基本等于自由溶液的数值，界面的浓度梯度与增长速度成正比，低约 6.6/10[91]。这只有在凝胶中动力学系数较低时才可能，支持β和 D 之间的相互作用，与转化肽动态规律第二特征相矛盾，见 2.7.1 节中的讨论。

表 2.1 显示，十几种蛋白质、蛋白质复合物及病毒结晶已知动态系数为（0.8～400）×10^{-4}cm/s [17,22,25,92,93]。铁蛋白分子对称性基团按 1、3、24 的顺序排列，卫星烟草花叶病毒为 60。较高分子的对称性和更高动态系数之间不存在相关性。这表明，限速台阶没有过渡态的衰变，应该促进高度对称性分子与高度过渡态熵及第三特性，见 2.7.1 节中的讨论。

表 2.1　动力学系数（β）、扩散系数（D）、有效分子直径（a）、分子点对称群（G）和各种系统的对称群（Z）顺序

系统	β/ (10^{-4}cm/s)	D/ (10^{-6}cm^2/s)	a/nm	G	Z	参考文献
胰岛素			6.5	$\bar{3}$ m	6	[103]
无丙酮	90	0.79				
约 5%丙酮	420					
脱铁铁蛋白	6	0.32	13	432	24	[25]
铁蛋白	6	0.32	13	432	24	[40]
R3 型刀豆球蛋白	5.8～26	0.4	3.5～8	3	3	[22]
二氧四氢嘧啶合成酶	3.6	0.16	18	m5	60	O. Gliko，未发表
过氧化氢酶	0.32	NA[a]	11.5	222	4	[104]
溶菌酶（111）		0.73	3	1	1	
典型性	2～3					
无步进聚集	22～45					[105]
溶菌酶（110）	2～3					[93]
卫星烟草花叶病毒	4～8	0.2	16	m5	60	[17]
索马甜	2	0.6	4.0	1	1	[107]
各种无机系统（ADP、KDP、明矾等）	约 100～1000	约 1～5	0.5	1、2、$\bar{2}$、m 等	1、2	[108]

a. NA：不可用；ADP：磷酸二氢铵；KDP：磷酸二氢钾

扩散限制动力学适用性的支持证据也应用于相变，包括小分子底物和来自磷酸二氢铵（ADP）结晶生长表明，吸附动力学的详细数据[94,95]。温度在 29～67℃的数据拟合到式（2.26）等值，$\bar{n}_k^{-1}=1$ 说明吸附位点的疑似密度[94,95]；本系统选择表面扩散机制，通过扩散吸附或过渡态衰减率限制的过程。拟合得到 Λ=13Å 和 U=27kJ/mol。刚才提到扩散限制情况下的 L 接近程度表明，这种机制是用于相变研究决定速度的一种方法。

该机制适用性的进一步有利证据，来自于约 10 种不同物质，在（28±7）kJ/mol 增长的动态屏障非常有限的分组的小分子[81]。这些物质的化学性质范围从无机盐到有机高分子化合物、蛋白质和病毒。因此，有限范围内的活化屏障对于过渡态动力学是无法预料的，其中活化复合物应该反映结晶化合物的化学变化。另外，我们注意到，假定扩散限制动力学在水溶液中的扩散率有效活化能为 8～17kJ/mol[38,96]。如果如式（2.26）所提示的一样，那么，（28±7）kJ/mol[81]的屏障中减去这些值就可以表征整体动力学，因为溶质和结晶表明之间的相互作用，屏障只可能保留 10～20kJ/mol。

因此，在最近其他的研究结果函数中实验数据表明，分子附着到结晶过的生长阶段动力学，或在溶液中的其他相变的动力学，在许多情况下，都是扩散限制。这适用于蛋白质，以及小分子的系统。重要的是，一旦获得这种结果状态，就会涉及溶质分子掺入到存在的附着位点动力学。在案例中，这样的位点非常少，或来自溶液聚集的传输很缓

慢，附着位点创立的动力学或传输动力学可以控制整体动力学。我们所争议的是，附着位点存在后溶质分子排列在它前面，还是掺入的速率仅由扩散限制，并且不受中间状态衰减的限制[40]。

2.8　从溶液到晶体的分子途径

溶液中晶体生长期间，溶质分子有溶液和纽结之间两种可能的途径：他们可以直接掺入[49,71]，也可以先吸附在台阶之间的台地（terraces），沿着它们扩散，然后到达台阶[48,49]。

如果晶体生长通过直接掺入机制，为争夺相邻台阶之间的供给就是温和的情形[71]。与此相反，对于供给受到限制的情况下，吸附竞争就很激烈[79]；它阻碍台阶的增长和台阶之间强力有效的吸引力。对台阶行列的稳定性、台阶群的外观和演化等这种戏剧性的影响[51]，最终影响晶体的质量和效用[97]。

这两种机制可直接理解为监测晶体表面吸附的溶质分子，类似于在低温下[98]金属原子的实验。然而，溶液在室温生长期间，吸附物质的扩散率约为 $10^{-8}cm^2/s$ [22,94]；也就是说，一个分子传递 100nm 需要约 0.01s。用原位原子力显微镜测定，该距离被典型的扫描探头覆盖的时间约 0.1s；也就是说，成像速度太慢无法检测和监控吸附分子。快速冷冻样品的电子显微镜，在若干情况下，可显示晶体表面吸附溶质分子的存在[99]；然而，由于技术原因，它们参与的增长不能自信用这种技术来判断。因为不可能直接测试，所以几种系统的生长机制的间接证据受到追捧。

通过比较，紧密排列台阶中的孤立台阶速率推导了几种晶体生长机制。银[100]和方解石[15,16]的两个速率相似值就是掺入机制的直接证据。相反，密集的台阶增长放缓是 KDP/ADP [21,94]、溶菌酶[101]和刀豆球蛋白[22]表面扩散机制的有利解释。对于这样的微观尺度数据的已知问题是，对有利于直接掺入的数据集的解释，还可以反映表面扩散范围比最短台阶分离探测更短[15,16]。因此，生长模型的关键性证据应该通过分子水平研究生长过程来获得[10,25]。

如 2.7.3 节中所述，从溶液中直接掺入的情况下（参见参考文献[72]和[78]）：

$$j_+ - j_- = v_+ C_e \Omega \exp\left(-\frac{U_{\max}}{k_B T}\right)\left[\frac{C}{C_e}-1\right], v_+ = \frac{D}{\Lambda a} \text{和} \frac{j_+}{j_-} = \frac{C}{C_e} \qquad (2.27)$$

在这里，$U_{\max}$ 是掺入到纽结的能量屏障[50,71]；在铁蛋白的情形中，它很可能需要在传入分子并形成纽结分子表面的亲水区周围清除水分子[82]。$\Omega=1.56\times10^{-18}cm^3$ 是每个铁蛋白分子晶体体积；$D=3.2\times10^{-7}cm^2/s$ 是铁蛋白扩散率[37]；Λ 是围绕最大值 $U_{\max}$ 表面分子间电位的曲率半径[73,74]，因此，少量水分子的大小排列应该为 5～10Å[95]。这种增长模式步进速度 v 是

$$v = \frac{a}{n_k}(j_+ - j_-) = \frac{\Omega C_e}{n_k}\frac{D}{\Lambda}\exp\left(-\frac{U_{\max}}{k_B T}\right)\left[\frac{C}{C_e}-1\right] \qquad (2.28)$$

通过表面扩散产量增长的类似考虑，净通量到表面的台阶是

$$j_{s+}-j_{s-}=v_{s+}n_e a^2\exp\left(-\frac{U_{s0}}{k_B T}\right)\left[\frac{n_s}{n_e}-1\right],v_{s+}=\frac{D_s}{\Lambda_s a}\text{和}\frac{j_+}{j_-}=\frac{n_s}{n_e} \tag{2.29}$$

式中，n_s和n_e分别为吸附铁蛋白表面浓度和平衡值；U_{s0}是从表面掺入纽结的能量屏障；D_s和Λ_s分别是表面扩散率和表面曲率U_s。对于台阶速率来说，一个通过$v=a/\overline{n}_k(j_{s+}-j_{s-})$得到，一个类似于式（2.25）的表达式。

为了评价台阶进出通量比率，我们使用图2.9揭示铁蛋白C/C_e=2，$j_+/j_-\leqslant1.105$。对于脱铁铁蛋白，类似图2.8的实验所示，在C/C_e=3，$j_+/j_-\leqslant25/22=1.14$。两种蛋白质的这些比率代表了最后平等式（2.27）的严重阻碍。这些阻碍行为不能归因于邻近晶体的溶液层结晶的枯竭。这个显然变成了约高于增长率100倍的因素[102]表明，直接掺入机制可能不适用。在朗缪尔吸附的情况下，$n_s=n_sC(B+C)^{-1}$（B为朗缪尔常数）和$n_s/n_e<C/C_e$。因此，通量进出的低速率增长可以与在表面吸附状态掺入机制并存。

在生长模型进一步的测试中，我们检查式（2.28）台阶速率规律。这里唯一未知参数是能量屏障U_0。在4种温度下v的测定和图2.13铁蛋白浓度产生E_{total}=(41±3)kJ/mol。在式（2.28）中，C_e和Ω不依赖于温度，Λ是大约几个水分子的大小，第一近似值不依赖于温度T[95]。分子遵循斯托克斯定律，$D=D_0\exp(-E_{visc}/k_BT)$，$E_{visc}$是阿伦尼乌斯型温度因子表达式，温度中依赖溶剂黏度。乙酸钠缓冲溶液中的氯化钠溶液，E_{visc}=7.4kJ/mol[38]。如式（2.28）显示的一样，$\overline{n}_k$有通过纽结能量w=3.8kJ/mol依赖T的弱近场指数。这就留下了$U_0\approx$30kJ/mol。发现接近28kJ/mol这个值，就像无机盐超过系统平均值一样，通过有机物到蛋白质和病毒[81]。

代入式（2.28），我们得到在C/C_e=2，v=0.0014nm/s和C/C_e=3，v=0.0028nm/s。这些值是低于实际观察到幅度的两个以上的数量级。0.20nm/s和0.31nm/s测定值需要$U_{max}\approx$18kJ/mol，超过图2.13中的测定范围。这种差异支持直接掺入机制的主张，但不适用铁蛋白的生长。我们的结论是涉及吸附在台地上的机制更好地对应于铁蛋白可用数据。注意，在铁蛋白/脱铁铁蛋白系统中，只有在短暂分离作用时，台阶才呈现吸引力。考虑到这一点，我们得出结论，特征表面扩散长度[49]必须短于几个晶格参数。需要注意的是台阶动力学尺度上限制数据的研究包括生长机制将是直接掺入。

一个相关的问题是：为什么系统热力学选择表面扩散机制直接掺入？这个问题只能解决分子水平用于该系统的数据。我们注意到，表面扩散机构运行时，能量屏障来确定从图2.13中的数据测定的能量屏障是这种机制的基本台阶的屏障函数，应表示为U_{sum}。如参考文献[79]和[95]中所述，$U_{sum}=U_{ads}-U_{desorb}+U_{SD}+U_{step}$，它们是屏障，分别用于吸附、脱吸附、表面扩散和掺入到台阶（图2.14）。由于铁蛋白的分子间键合能量效果，应该等于脱铁铁蛋白的效果：$\varphi\approx3k_BT$=7.4kJ/mol[25]。我们可以有把握地假设，在面心平方表面（111）的吸附-解吸附，$U_{ads}-U_{desorb}=DH_{ads}=-3\varphi$=−22kJ/mol。当吸附分子之间的相互作用被忽略时，可能U_{sd}的最低值会出现在两个吸附位点之间，通道只有一个键损坏的时间；因此，$U_{SD}\geqslant\varphi$。产生$U_{step}\leqslant$44kJ/mol，类似于ADP值[95]。因为同样数量的3个键，产生于吸附和掺入到台阶期间，我们可以大致假设$U_{ads}\approx U_{step}$。因此，遇到通道内分子到纽结的最高屏障是≤44kJ/mol。对于直接掺入到纽结的情况，所有6个键都是同时创建，$U_{kink}\sim U_{ads}+U_{step}\approx$88kJ/mol。粗略估计产量，这将使通过这种途径生长被～$\exp[(88\,000-44\,000)/RT]\sim10^8$因素所减慢。

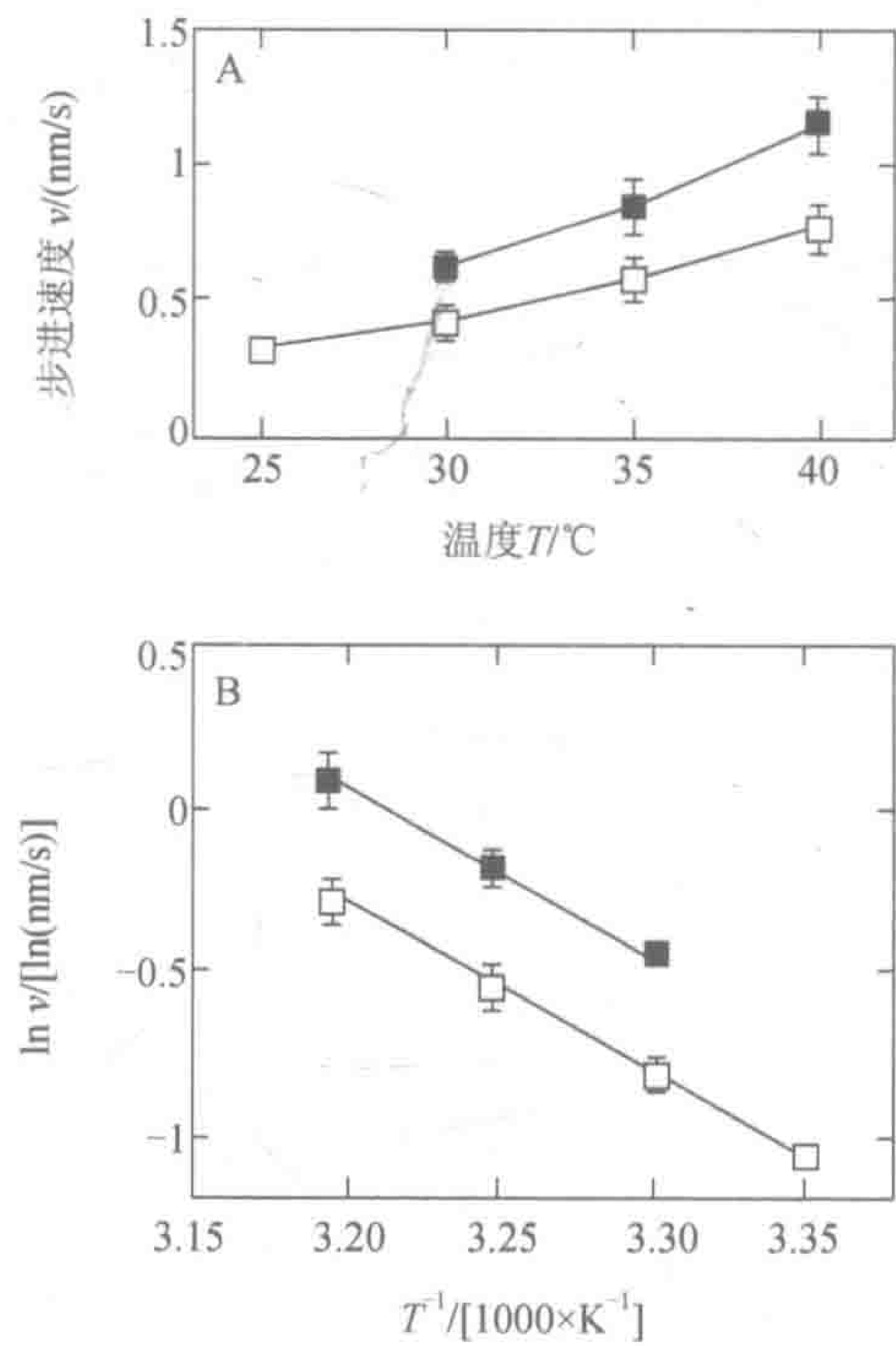


图 2.13　温度条件下铁蛋白生长台阶速率 v 的依赖性（A）和阿伦尼乌斯坐标（B）。(■) 在 C/C_e=4；(□) 在 C/C_e=3，对于台阶步进展的每一个点，与原位原子力显微镜图像分子分辨率的序列进行比较；约 20 个这样的测定平均值。误差线代表平均值的 90%置信区间（摘自参考文献[31]）

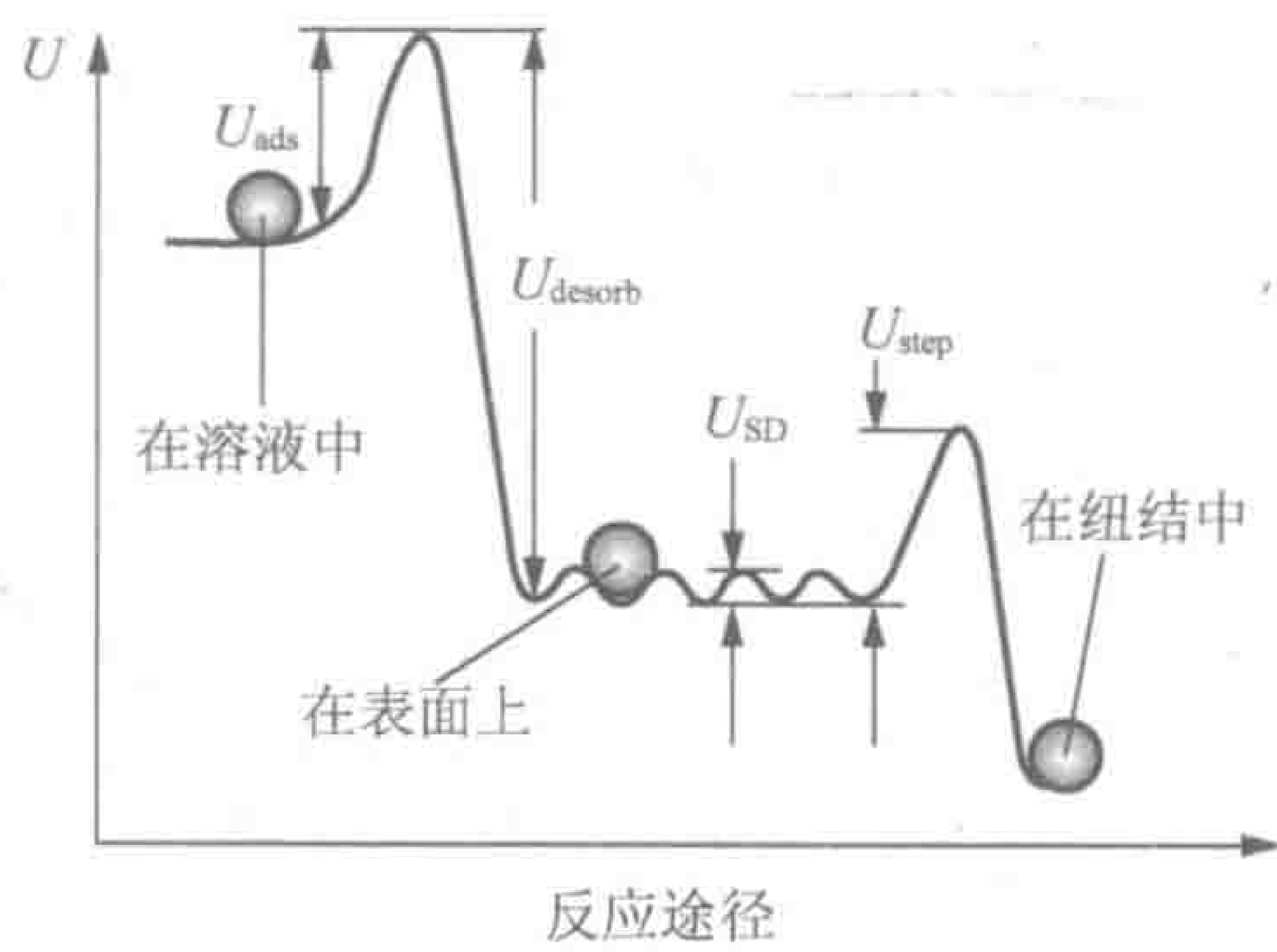


图 2.14　表面扩散机制能量格局。其中符号含义请看原文（改自参考文献[109]）

致谢

这些研究没有我的合作者 S. T. Yau、K. Chen 和 D. Petsev 参加原始研究审核工作的贡献将不可能完成。我感谢 O. Galkin 对手稿的关键评论。感谢美国航空航天局生物和物理办公室几年的慷慨财政支持。

参 考 文 献

[1] Theil, E. C. (1987) Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants and microorganisms. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 289–315.

[2] Massover, W. H. (1993) Ultrastructure of ferritin and apoferritin: a review. *Micron* 24, 389–437.

[3] Harrison, P. M. and Arosio, P. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 161–203.

[4] 4. Lawson, D. M., Artymiuk, P. J., Yewdall, S. J., et al. (1991) Solving the structure of human H ferritin by genetically engineering intermolecular crystal con- tacts. *Nature* 349, 541–544.

[5] Hempstead, P . D., Y ewdall, S. J., Fernie, A. R., Lawson, D. M., Artymiuk, P . J., Rice, D. W., Ford, G. C., and Harrison, P. M. (1997) Comparison of the three dimensional structures of recombinant human H and horse L ferritins at high resolution. *J. Mol. Biol.* 268, 424–448.

[6] Taft, K. L., Papaefthymiou, G. C., and Lippard, S. J. (1993) A mixed-valent polyiron oxo complex that models the biomineralization of the ferritin core. *Science* 259, 1302–1305.

[7] Pereira, A. S., Tavares, P., Lloyd, S. G., Danger, D., Edmondson, D. E., Theil, E. C., and Huynh, B. H. (1997) Rapid and parallel formation of Fe^{3+} multimers, including a trimer, during H-type subunit ferritin mineralization. *Biochemistry* 36, 7917–7927.

[8] Gider, S., Awschalom, D. D., Douglas, T., Mann, S., and Chaparala, M. (1995) Classical and quantum magnetic phenomena in natural and artificial ferritin proteins [see comments]. *Science* 268, 77–80.

[9] Yang, D. and Nagayama, K. (1995) Permeation of small molecules into the cavity of ferritin as revealed by proton nuclear magnetic resonance relaxation. *Biochem. J.* 307, 253–256.

[10] Yau, S. T., Petsev, D. N., Thomas, B. R., and Vekilov, P. G. (2000) Molecular-level thermodynamic and kinetic parameters for the self-assembly of apoferritin molecules into crystals. *J. Mol. Biol.* 303, 667–678.

[11] Hansma, P. K., Cleveland, J. P., Radmacher, M., et al. (1994) Tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Appl. Phys. Lett.* 64, 1738–1740.

[12] Noy, A., Sanders, C. H., Vezenov, D. V., Wong, S. S., and Lieber, C. M. (1998) Chemically sensitive imaging in tapping mode by chemical force microscopy: relationship between phase lag and adhesion. *Langmuir* 14, 1508–1511.

[13] Durbin, S. D. and Carlson, W. E. (1992) Lysozyme crystal growth studied by atomic force microscopy. *J. Crystal Growth* 122, 71–79.

[14] Durbin, S. D., Carson, W. E., and Saros, M. T. (1993) In situ studies of protein crystal growth by atomic force microscopy. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 26, B128– B132.

[15] Hillier, P. E., Manne, S., Hansma, P. K., and Gratz, A. J. (1993) Atomic force microscope: a new tool for imaging crystal growth processes. *Faraday Discuss.* 95, 191–197.

[16] Gratz, A. J., Hillner, P. E., and Hansma, P. K. (1993) Step dynamics and spiral growth on calcite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 57, 491–495.

[17] Malkin, A. J., Land, T. A., Kuznetsov, Y. G., McPherson, A., and DeYoreo, J. J. (1995) Investigation of virus crystal growth mechanism by in situ atomic force microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 75, 2778–2781.

[18] McPherson, A., Malkin, A. J., and Kuznetsov,Y. G. (1995) The science of macromolecular crystallization. *Structure* 3, 759–768.

[19] Malkin, A. J., Kuznetsov, Y. G., Land, T. A., DeYoreo, J. J., and McPherson, A. (1996) Mechanisms of growth of protein and virus crystals. *Nat. Struct. Biol.* 2, 956–959.

[20] Ng, J. D., Kuznetsov, Y. G., Malkin, A. J., Keith, G., Giege, R., and McPherson, A. (1997) Visualization of RNA crystal growth by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.* 25, 2582–2588.

[21] De Yoreo, J. J., Land, T. A., and Dair, B. (1994) Growth morphology of vicinal hillocks on the {101} face of KH_2PO_4: from step flow to layer-by-layer growth. *Phys. Rev. Lett.* 73, 838–841.

[22] Land, T. A., DeYoreo, J. J., and Lee, J. D. (1997) An in-situ AFM investigation of canavalin crystallization kinetics.

Surf. Sci. 384, 136–155.

[23] Yip, C. M. and Ward, M. D. (1996) Atomic force microscopy of insulin single crystals: direct visualization of molecules and crystal growth. *Biophys. J.* 71, 1071–1078.

[24] Yip, C. M., DePhelippis, M. R., Frank, B. H., Brader, M. L., and Ward, M. D. (1998) Structural and morphological characterization of ultralente insulin crystals by atomic force microscopy: evidence of hydrophobically driven assembly. *Biophys. J.* 75, 1172–1179.

[25] Yau, S. T., Thomas, B. R., and Vekilov, P. G. (2000) Molecular mechanisms of crystallization and defect formation. *Phys. Rev. Lett.* 85, 353–356.

[26] Lin, H., Yau, S. T., and Vekilov, P. G. (2003) Dissipating step bunches during crystallization under transport control. *Phys. Rev. E* 67, 0031606.

[27] Giesen-Seibert, M., Jentjens, R., Poensgen, M., and Ibach, H. (1993) Time dependence of step fluctuations on vicinal copper (1119) surfaces investigated by tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 71, 3521–3524.

[28] Poensgen, M., Wolf, J., Frohn, J., Giesen, M., and Ibach, H. (1992) Stepdynamics on Ag(111) and Cu(100) surfaces. *Surf. Science* 274, 430–440.

[29] Kitamura, N., Lagally, M. G., and Webb, M. B. (1993) Real-time observations of vacancy diffusion on Si(001)-(2x2) by scanning tuneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 71, 2081–2085.

[30] Swartzentruber, B. S., Mo, Y. W., Kariotis, R., Lagally, M. G., and Webb, M. B. (1990) Direct determination of site and kink energies of vicinal Si(001). *Phys. Rev. Lett.* 65, 1913–1916.

[31] Chen, K. and Vekilov, P. G. (2002) Evidence for the surface diffusion mechanism of solution crystallization from molecular-level observations with ferritin. *Phys. Rev. E* 66, 021606.

[32] Choi, S. C. (1978) *Introductory Applied Statistics in Science*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.

[33] Vekilov, P. G., Alexander, J. I. D., and Rosenberger, F. (1996) Nonlinear response of layer growth dynamics in the mixed kinetics-bulk transport regime. *Phys. Rev. E* 54, 6650–6660.

[34] Gliko, O., Booth, N. A., Rosenbach, E., and Vekilov, P. G. (2002) Phase-shifting interferometry for the study of the step dynamics during crystallization of proteins. *Crystal Growth Design* 2, 381–385.

[35] Gliko, O., Booth, N. A., and Vekilov, P. G. (2002) Step bunching in adiffusion-controlled system: phase-shifting interferometry investigation of ferritin. *Acta Crystallogr. Sect. D* 58, 1622–1627.

[36] Gliko, O. and Vekilov, P. G. (2002) Spatio-temporal step patterns during crystal growth in a transport controlled system. *J. Phys. Chem.* 106, 11,800–11,804.

[37] Petsev, D. N., Thomas, B. R., Yau, S. T., and Vekilov, P. G. (2000) Interactions and aggregation of apoferritin molecules in solution: effects of added electrolytes. *Biophys. J.* 78, 2060–2069.

[38] Fredericks, W. J., Hammonds, M. C., Howard, S. B., and Rosenberger, F. (1994) Density, thermal expansivity, viscosity and refractive index of lysozyme solutions at crystal growth concentrations. *J. Crystal Growth* 141, 183–192.

[39] Muschol, M. and Rosenberger, F. (1995) Interaction in undersaturated and supersaturated lysozyme solutions: static and dynamic light scattering results. *J. Chem. Phys.* 103, 10,424–10,432.

[40] Petsev, D. N., Chen, K., Gliko, O., and Vekilov, P. G. (2003) Diffusion-limited kinetics of the solution-solid phase transition of molecular substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 792–796.

[41] Sun, S. F. (1994) *Physical Chemistry of Macromolecules*, John Wiley & Sons, New York.

[42] Stranski, I. N. (1928) Zur Theorie des Kristallwachstums. *Z. Phys. Chem.* 136, 259–278.

[43] Stranski, I. N. and Kaischew, R. (1934) Über den Mechanismus des Gleichge- wichtes kleiner Kriställchen. I. *Z. Phys. Chem.* B26, 100–113.

[44] Kaischew, R. and Stranski, I. N. (1937) Überdie Thomson-Gibbs'sche Gleichung bei Kristallen. *Z. Phys. Chem.* B35, 427–432.

[45] Eisenberg, D. and Crothers, D. (1979) *Physical Chemistry with Applications to Life Sciences*, Benjamin/Cummins, Menlo Park, NJ.

[46] Berry, P. S., Rice, S. A., and Ross, J. (2000) *Physical Chemistry*, Oxford University Press, New York.

[47] Hill, T. L. (1986) *Introduction to Statistical Thermodynamics*, New York.

[48] Volmer, M. (1939) *Kinetik der Phasenbildung,* Steinkopff, Dresden, Germany.

[49] Burton, W. K., Cabrera, N., and Frank, F. C. (1951) The growth of crystals and equilibrium structure of their surfaces. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. A* 243, 299–360.

[50] Chernov, A. A. (1984) *Modern Crystallography III, Crystal Growth*, Springer, Berlin.

[51] Williams, E. D. and Bartelt, N. C. *(1991) Thermodynamics of surface morphology. Science* 251, 393–400.

[52] Chernov, A. A., Rashkovich, L. N., Yamlinski, I. V., and Gvozdev, N. V. (1999) Kink kinetics, exchange fluxes, 1D "nucleation" and adsorption on the (010) face of orthorhombic lysozyme crystals. *J. Phys.:Condens. Matter* 11, 9969–9984.

[53] Teng, H. H., Dove, P. M., Qrme, C. A., and De Yoreo, J. J. (1998) Thermodynamics of calcite growth: baseline for understanding biomineral formation. *Science* 282, 724–727.

[54] Kuipers, L., Hoogeman, M., and Frenken, J. (1993) Step dynamics on Au(110) studied with a high-temperature, high-speed scanning tunneling microscope. *Phys. Rev. Lett.* 71, 3517–3520.

[55] Swartzentruber, B. S. (1998) Fundamentals of surface step and island formation mechanisms. *J. Crystal Growth* 188, 1–10.

[56] Petsev, D. N., Thomas, B. R., Yau, S. -T., Tsekova, D., Nanev, C., Wilson, W. W., and Vekilov, P. G. (2001) Temperature-independent solubility and interactions between apoferritin monomers and dimers in solution. *J. Crystal Growth* 232, 21–29.

[57] Atkins, P. (1998) *Physical Chemistry*, Freeman, New York.

[58] Israelachvili, J. N. (1995) *Intermolecular and Surface Forces*, Academic, New York.

[59] Eaton, W. A., Munoz, V., Thompson, P. A., Chan, C. K., and Hofrichter, J. (1997) Submillisecond kinetics of protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 10–14.

[60] Tanford, C. (1980) *The Hydrophobic Effect: Formation of Micellesand Biological Membranes*, John Wiley & Sons, New York.

[61] Eisenberg, D. and Kauzmann, W. (1969) *The Structure and Properties of Water*, Oxford, New York, University Press.

[62] Dunitz, J. D. (1994) The entropic cost of bound water in crystals and biomolecules. *Nature* 264, 670.

[63] Li, M., Nadarajah, A., and Pusey, M. L. (1999) Growth of (101) faces of tetragonal lysozyme crystals: determination of the growth mechanism. *Acta Cryst. Sect. D* 55, 1012–1022.

[64] Li, M., Nadarajah, A., and Pusey, M. L. (1999) Determining the molecular-growth mechanisms of protein crystal faces by atomic force microscopy. *Acta Cryst. Sect. D* 55, 1036–1045.

[65] Nadarajah, A. and Pusey, M. L. (1997) Growth mechanism of the (110) face of tetragonal lysozyme crystals. *Acta Cryst. Sect. D* 53, 524–534.

[66] Alfonso, C., Bermond, J. M., Heyraud, J. C., and Metois, J. J. (1992) Themean-dering of steps and the terrace width distribution on clean Si(111). *Surf. Sci.* 262, 371–381.

[67] Bartelt, N. C., Einstain, T. L., and Williams, E. D. (1990) The influence of step-step interactions on step wandering. *Surf. Sci. Lett.* 240, L591–L598.

[68] Ihle, T., Misbah, C., and Pierre-Louis, O. (1998) Equilibrium step dynamics of vicinal surfaces revisited. *Phys. Rev. B* 58, 2289–2309.

[69] Pimpinelli, A., Villain, J., Wolf, D. E., Metois, J. J., Heyraud, J. C., Elkinari, I., and Uimin, G. (1993) Equilibrium step dynamics on vicinal surfaces. *Surf. Sci.* 295, 143–153.

[70] Kuipers, L., Hoogeman, M. S., and Frenken, J. W. M. (1995) Step and kink dynamics on Au(110) and Pb(111) studied with a high-speed STM. *Phys. Rev. B* 52, 11,387–11,397.

[71] Chernov, A. A. (1961) The spiral growth of crystals. *Sov. Phys. Uspekhi* 4, 116–148.

[72] Chernov, A. A. and Komatsu, H. (1995) Topics in crystal growth kinetics, in *Science and Technology of Crystal Growth* (van der Eerden, J. P. and Bruinsma, O. S. L., eds.), Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, pp. 67–80.

[73] Smoluchowski, M. (1916) Drei Vorträge uber Diffusion, Brownsche Bewegung und Koagulation von Kolloidteilchen.

Physik Z. 17, 557–585.

[74] Eyring, H., Lin, S. H., and Lin, S. M. (1980) *Basic Chemical Kinetics*, John Wiley & Sons, New York.

[75] Neilsen, A. E. (1967) Nucleation in aqueous solutions, in *Crystal Growth* (Peiser, S., ed.), Pergamon, Oxford, UK, pp. 419–426.

[76] Kahlweit, M. (1969) Nucleation in liquid solutions, in *Physical Chemistry* vol. VII (Eyring, H., ed.), Academic, New York, pp. 675–698.

[77] Walton, A. G. (1969) Nucleation in liquids and solutions, in *Nucleation* (Zettlemoyer, A. C., ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 225–307.

[78] Chernov, A. A. and Komatsu, H. (1995) Principles of crystal growth in protein crystallization, in *Science and Technology of Crystal Growth* (van der Eerden, J. P. and Bruinsma, O. S. L., eds.), Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, pp. 329–353.

[79] Gilmer, G. H., Ghez, R., and Cabrera, N. (1971) Ananalysis of combined volume and surface diffusion processes in crystal growth. *J. Crystal Growth* 8, 79–93.

[80] van der Eerden, J. P. (1994) Crystal growth mechanisms, in *Handbook of Crystal Growth* vol. 1a (Hurle, D., ed.), North Holland, Amsterdam, pp. 307–476.

[81] De Yoreo, J. J. (2001) Eight years of AFM: what has it taught us about solution crystal growth, in *Thirteenth International Conference on Crystal Growth* (Hibiya, T., Mullin, J. B., and Uwaha, M., eds.), Elsevier, Kyoto, Japan.

[82] Petsev, D. N. and Vekilov, P. G. (2000) Evidence for non-DLVO hydration interactions in solutions of the protein apoferritin. *Phys. Rev. Lett.* 84, 1339–1342.

[83] Israelachvili, J. and Pashley, R. (1982) The hydrophobic interaction is long range decaying exponentially with distance. *Nature* 300, 341,342.

[84] Israelachvili, J. and Wennerstrom, H. (1996) Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions. *Nature* 379, 219–225.

[85] von Smoluchowski, M. (1918) Versuch einer matematischen theorie der koagulationskine. *Z. Phys. Chem.* 92, 129–135.

[86] Zeldovich, J. B. (1942) On the theory of formation of new phases: cavitation. *J. Theor. Exp. Phys. (USSR)* 12, 525–538.

[87] Zwanzig, R. (2001) *Nonequilibrium Statistical Mechanics*, Oxford University Press, Oxford, UK.

[88] Frenkel, J. (1932) *Phys. J. USSR* 1, 498–510.

[89] Broughton, J. Q., Gilmer, G. H., and Jackson, K. A. (1982) Crystallization rates of a Lennard-Jones liquid. *Phys. Rev. Lett.* 49, 1496–1500.

[90] Garcia-Ruiz, J. M. and Moreno, A. (1997) Growth kinetics of protein single crystals in the gel acupuncture technique. *J. Crystal Growth* 178, 393–401.

[91] Hou, W. B., Kudryavtsev, A. B., Bray, T. L., DeLucas, L. J., and Wilson, W. W. (2001) Real time evolution of concentration distribution around tetragonal lysozyme crystal: case study in gel and free solution. *J. Crystal Growth* 232, 265–272.

[92] Malkin, A. J., Kuznetsov, Y. G., Glanz, W., and McPherson, A. (1996) Atomic force microscopy studies of surface morphology and growth kinetics of thaumatin crystallization. *J. Phys. Chem.* 100, 11,736–11,743.

[93] Vekilov, P. G., Thomas, B. R., and Rosenberger, F. (1998) Effects of convective solute and impurity transport on protein crystal growth. *J. Phys. Chem.* 102, 5208–5216.

[94] Vekilov, P. G., Kuznetsov, Y. G., and Chernov, A. A. (1992) Interstep interaction in solution growth; (101) ADP face. *J. Crystal Growth* 121, 643–655.

[95] Vekilov, P. G., Kuznetsov, Y. G., and Chernov, A. A. (1992) The effect of temperature on step motion: (101) ADP face. *J. Crystal Growth* 121, 44–52.

[96] Borchers, H., ed. (1955) Landoldt-Bornstein numerical data and functional relationships, in *Materials Values and Mechanical Behaviour of Nonmetals*, vol. IV, pt. II, Springer, Berlin.

[97] Bauser, E. (1994) Atomic mechanisms in semiconductor liquid phase epitaxy, in *Handbook of Crystal Growth*, vol. 3b

(Hurle, D. T. J., ed.), North Holland, Amsterdam, pp. 879–911.

[98] Ehrlich, G. and Hudda, F. G. (1966) Asymmetric capture at steps. *J. Chem. Phys.* 44, 1039–1052.

[99] Braun, N., Tack, J., Fischer, M., Bacher, A., Bachmann, L., and Weinkauf, S. (2000) Electron microscopic observations on protein crystallization: adsorption layers, aggregates and crystal defects. *J. Crystal Growth* 212, 270–282.

[100] Bostanov, V., Staikov, G., and Roe, D. K. (1975) Rate of propagation of growth layers on cubic crystal faces in electrocrystallization of silver. *J. Electrochem. Soc.* 122, 1301–1305.

[101] Vekilov, P. G., Monaco, L. A., and Rosenberger, F. (1995) Facet morphology response to non-uniformities in nutrient and impurity supply. I. Experiments and interpretation. *J. Crystal Growth* 156, 267–278.

[102] Lin, H., Petsev, D. N., Yau, S. T., Thomas, B. R., and Vekilov, P. G. (2001) Lower incorporation of impurities in ferritin crystals by suppression of convection: modeling results. *Crystal Growth Design* 1, 73–79.

[103] Reviakine, I., Georgiou, D. K., and Vekilov, P. G. (2003) Capillarity effects on the crystallization kinetics: insulin. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 11,684–11,693.

[104] Malkin, A., Kuznetsov, Y., and McPherson, A. (1997) An in situ AFM investigation of catalase crystallization. *Surf Sci.* 393, 95–107.

[105] Vekilov, P. G., Ataka, M., and Katsura, T. (1993) Laser Michelson interferometry investigation of protein crystal growth. *J. Crystal Growth* 130, 317–320.

[106] Vekilov, P. G. and Rosenberger, F. (1996) Dependence of lysozyme growth kinetics on step sources and impurities. *J. Crystal Growth* 158, 540–551.

[107] Kuznetsov, Y. G., Konnert, J., Malkin, A. J., and McPherson, A. (1999) The advancement and structure of growth steps on thaumatin crystals visualized by atomic force microscopy at molecular resolution. *Surf. Sci.* 440, 69–80.

[108] Vekilov, P. G. and Chernov, A. A. (2002) The physics of protein crystallization, in *Solid State Physics* vol. 57 (Ehrenreich, H. and Spaepen, F., eds.), Academic, New York, pp. 1–147.

[109] Bennema, P. (1967) Analysis of crystal growth models for slightly supersaturated solutions. *J. Crystal Growth* 1, 278–286.

第 3 章　生物材料的纳米结构体系

Esther H. Lan, Bruce Dunn, Jeffrey I. Zink

概　　述

溶胶-凝胶加工是一种在无机透明材料上固定化生物分子的化学技术。生物分子掺入物定居在互连介孔网络，成为整个纳米结构材料的组成部分。本章回顾溶胶-凝胶固定化的方法，并讨论如何使一些蛋白质在化学和热环境中稳定。还综述了扩散分析，分子通过衬底达到固定化生物分子传感器的应用。

关键词：溶胶-凝胶；气凝胶；干凝胶；溶胶-凝胶包埋；丁酰胆碱酯酶；肌酸激酶；皮质醇

3.1　导　　论

固定化生物分子的方法很多，包括包埋法、微胶囊化、共价连接和吸附。本章综述涉及包埋法和微胶囊化两者共同特征的固定化过程。在该方法中，将生物分子包埋到无机材料的孔隙中，该无机材料用溶胶-凝胶化学制备，即在温和条件（室温）下用“软化学”方法之一合成的固态材料。产生的衬底构成纳米结构材料。有两个相：固体胶体粒子排列成具有互相贯穿介孔的网络结构，溶剂相填充到介孔。在富溶剂环境下生物分子掺入物定居于网络中的介孔，并成为纳米结构整体材料的组成部分。

纳米结构材料对性能产生深远影响。当掺入物分子尺度小于平均孔直径时，这些（通常是低分子质量）分子就在溶剂填充的孔中进出移动。然而，大分子质量的生物分子就限制在溶胶纳米结构形成的笼中。生物分子能局部移动，但不能直线移动。在溶胶-凝胶衍生材料中固定了各种蛋白质，包括球状蛋白和膜结合蛋白、酶和其他生物系统。在几乎所有的情况下，纳米结构环境中生物分子掺入物的化学性质与溶液中的生物分子相似，但与多孔无机材料有细微差别。固相和液相两者在溶胶-凝胶包埋材料的性质上明显不同，生物分子掺入物与溶胶-凝胶基质之间相互作用决定特异性生物系统的反应途径。

本章首先回顾了溶胶-凝胶化学的基本概念和生物分子包埋的应用，然后，我们详细综述蛋白质的稳定性，其中溶胶-凝胶包埋提供最优秀性能。回顾不同类型材料的稳定性后，我们特别关注肌酸激酶的包埋特性。最后，介绍最近在我们实验室研究中，溶胶-凝胶基质中有机和生物分子的结合获得了更大功能的材料，后者是针对传感器的应用。

3.1.1　溶胶-凝胶制备

溶胶-凝胶制备是产生无定形无机固体如玻璃的低温合成技术。溶胶通常被定义为在液体中有小于 100nm 悬浮颗粒的胶体溶液，而凝胶是半固体胶体。溶胶-凝胶明显的优点之一是，在室温下制备的玻璃具有优异的均匀性和高纯度。使用这种方法制造的玻璃是高度多孔的，所以所选的掺合剂能掺入到多孔玻璃基质中。此外，也可以使这些溶胶-凝胶材料光学上透明，因而它们可以用作传感器。长期以来，人们对含有各种有机和无机掺入物的透明玻璃有相当大的兴趣，而且在低温下制造的玻璃非常有益，因为在高温中许多掺入物会发生不可逆的变化。

在溶胶-凝胶制备过程中，从水解作用形成胶体溶胶和聚缩合形成有机金属前体。其前体是典型的金属醇盐 $M(OR)_n$，其中 OR 是 OCH_3（甲氧基）、OC_2H_5（乙氧基）等。最常用醇盐制备基于二氧化硅的材料是四甲氧基硅烷（TMOS）（$OR{=}OCH_3$）和四乙氧基硅烷（$OR{=}OC_2H_5$），因为用这些材料水解和缩合能够很好控制。溶胶-凝胶制备可分为以下步骤：溶胶形成、凝胶化、干燥和稠化作用，如图 3.1 所示。从图 3.1 可以看到，干燥（溶剂蒸发或萃取）的方法可以极大地影响基质的最终结构、孔径大小和孔体积。依赖人工制造方法，获得的材料可以是一个整体件、薄膜或纤维的形式。

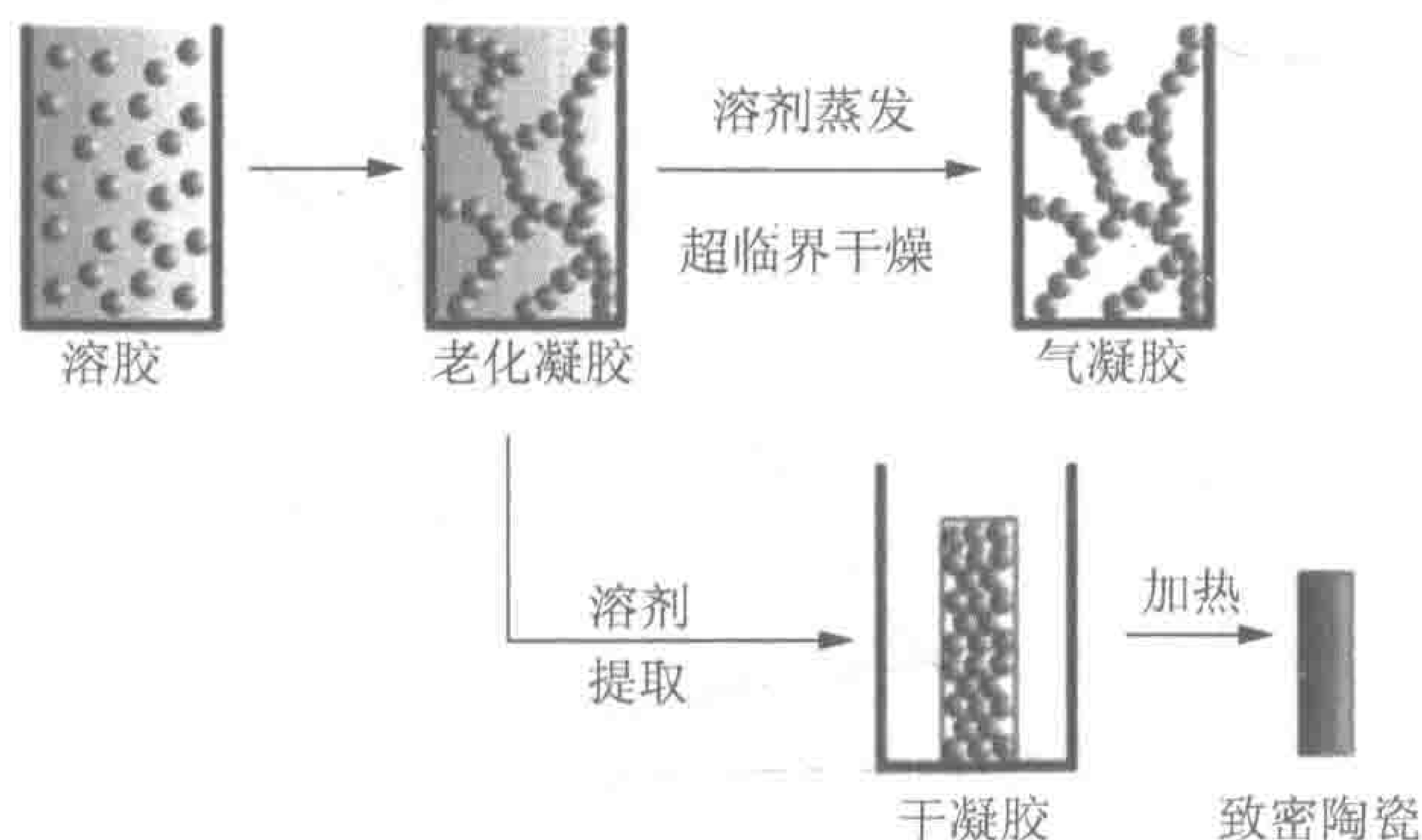


图 3.1　溶胶-凝胶处理的湿（老化）凝胶、气凝胶和干凝胶制备过程示意图（摘自参考文献[4]）

在水解反应中，前体（金属醇盐）在催化剂的存在下与水混合。添加醇作为助溶剂，因为醇盐和水是不混溶的，但两者都溶于乙醇和甲醇。水解步骤导致形成硅烷醇基（Si—OH），即中间体，和副产物乙醇。水解后紧接着缩合，即硅烷醇基团缩合形成硅氧烷基团（Si—O—Si），释放副产物醇或水。注意：水解和缩合反应同时发生。两个反应如图 3.2 所示。

各种因素影响水解和缩合反应及凝胶的最终显微结构。这些因素包括：溶液 pH、温度、醇盐的性质、醇的用量、醇与水和乙醇的比例及使用催化剂的类型。水解和缩合的相对速率确定凝胶[1]的最终结构，这些因素对聚缩合反应和最终显微结构的效果已有广泛的研究[1~5]。玻璃的最终结构很大程度上可通过控制水解和缩合反应而达到。快速水解和缓慢缩聚有利于更高度浓缩硅聚合物的形成，而缓慢水解和快速缩合导致浓缩的聚

合物减少[2]。水与金属醇盐的比例，其中，r_w=[水]/[金属醇盐]，也可用于剪裁凝胶网。r_w<4时，该结构主要是线性聚合物，而如果r_w>4时，其结构主要是交联的三维网络结构[5]。另一个控制凝胶结构的关键因素是pH。在酸性条件下制备的硅酸盐溶胶（酸催化）形式主要是线性聚合物，干燥后形成的凝胶具有相对小孔的密度（图3.3A）。另外，在碱性条件下（碱催化）制备的硅溶胶主要形成支链簇，干燥时，凝胶网络更开放，具有更大的网孔（图3.3B）[3]。

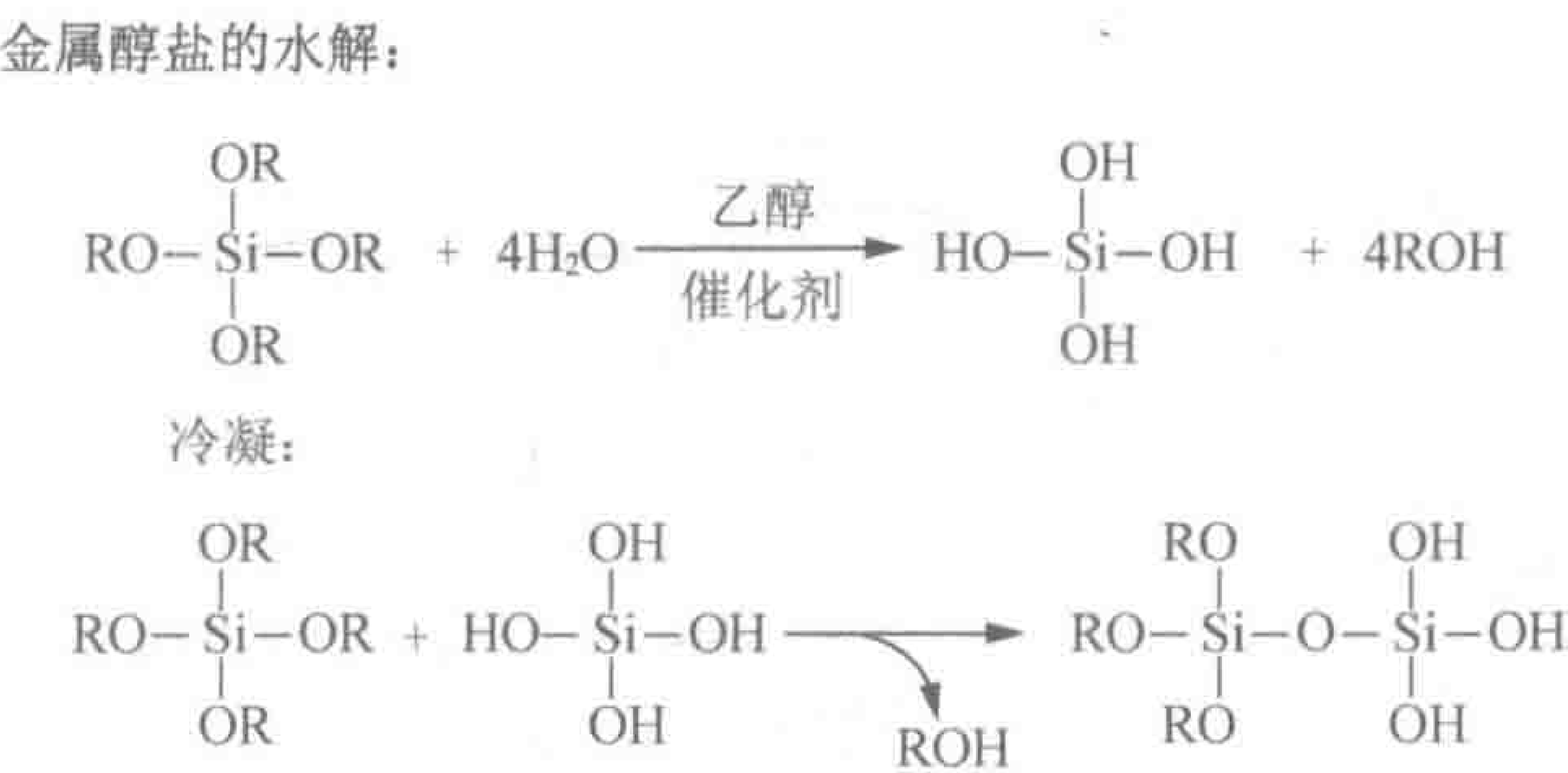


图3.2　溶胶-凝胶加工的水解和缩合反应

这里R可以是H或任何烷基、CH_3、CH_2CH_3等

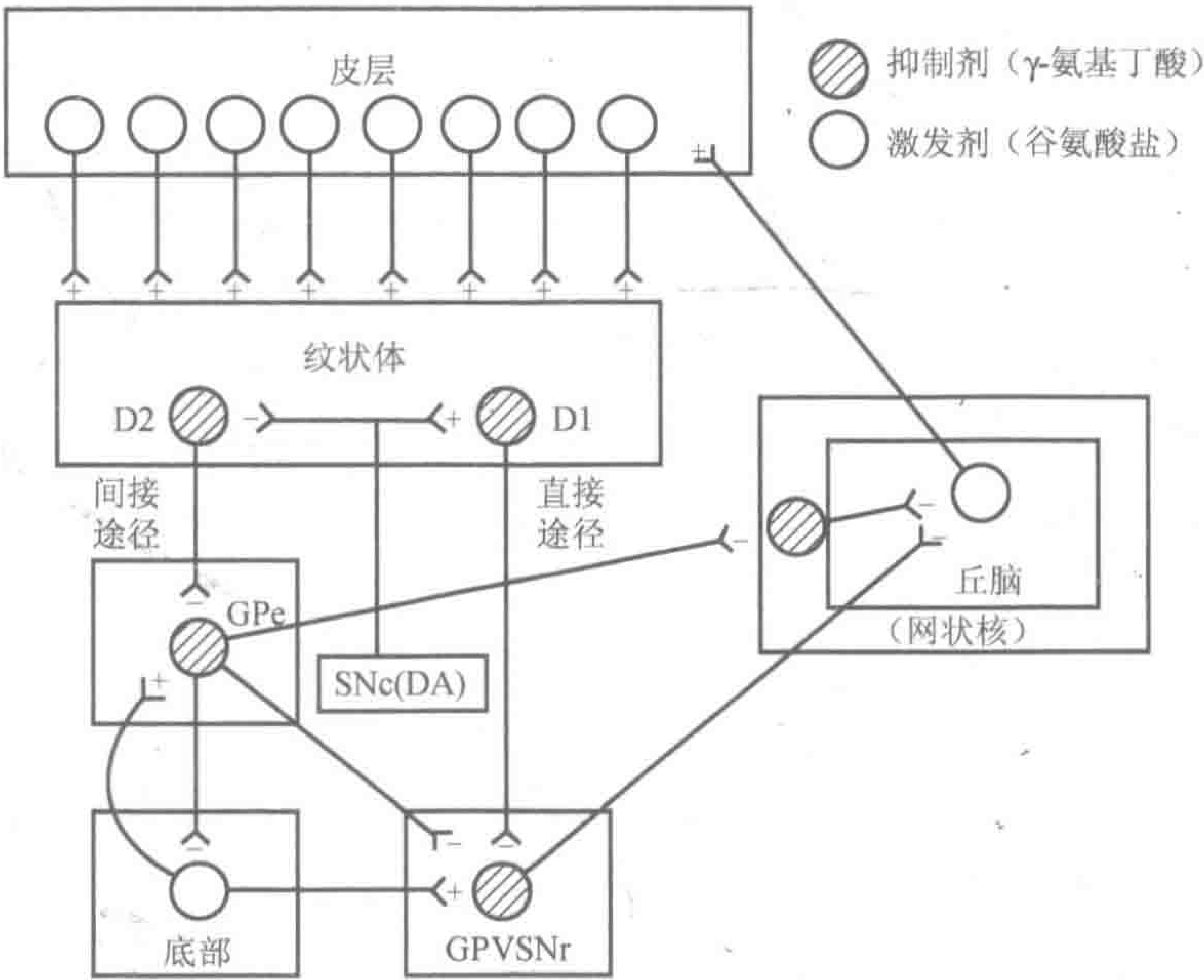


图3.3 （A）酸催化二氧化硅主要形成线性聚合物，干燥时，具有相对小孔凝胶密度溶胶-凝胶加工过程。（B）碱性催化二氧化硅主要形成支链簇，经干燥，凝胶网络更开放，具有更大孔网络（摘自参考文献[3]）

随着水解和缩合聚合反应继续进行，溶胶变成凝胶。凝胶化点被定义为二氧化硅基质形成连续固体[6]的时间，或该材料能够支持应力弹性凝胶点[1]。溶胶至凝胶转变后，黏

度的急剧增加和聚合物结构变得僵硬。溶胶至凝胶转变是不可逆的，体积上不变化。凝胶化后的材料由两个不同的阶段组成：无定形二氧化硅颗粒（直径为 5～10nm）和间质液相[6]。只要保持形成空隙的液相（即孔液）这种材料称为“湿”凝胶。随着凝胶的老化、缩聚的继续，网络的连接性增加，它的结构和性质也继续改变。

可以用大范围几何形状，从大容量材料（尺寸＞1mm）到（厚度从几十到几百纳米）薄膜来制备溶胶-凝胶材料。在这些材料的人工制造中，如果细孔液被蒸发，凝胶开始干燥。干燥过程伴随着相当大的质量损失和体积收缩。通常情况下，凝胶的干燥是在环境条件下完成的。随着间隙液体从孔中蒸发，大的毛细管力引起孔隙塌陷和材料收缩。干燥的凝胶称为“干凝胶”（图 3.1）。二氧化硅的溶胶-凝胶材料，干凝胶通常是其原体积的≤50%。也可以使用超临界干燥来进行溶剂萃取。超临界干燥凝胶称为“气凝胶”（图 3.1）。在这些条件下，能够除去孔液但没有细孔塌陷和随后的收缩，形成相对较大孔径和多孔体积的轻量级材料。

3.2　溶胶-凝胶基质包埋生物分子

在溶胶-凝胶衍生的玻璃中，蛋白质和其他生物分子的包埋是一个有趣的研究领域，因为它涉及将具有良好定义结构的微妙生物分子定位于类似、牢固和无序的基质孔隙中。在溶胶-凝胶衍生的玻璃中包埋生物分子已经持续了十多年，在这一领域第一个研究结果发表于 1990 年[7]。生物掺入的溶胶-凝胶材料的首批研究报道碱催化二氧化硅包埋的碱性磷酸酶，将所得的溶胶-凝胶材料具有难以理解的低酶活性。在随后的工作中，开发了产生光学透明材料的溶胶-凝胶合成路线[8]。蛋白质的铜-锌超氧化物歧化酶，细胞色素 c 和肌红蛋白被固定在透明石英玻璃的孔中，用于光谱监测蛋白质的生物学功能和活性。从那时起，各种生物分子包括抗体、酶、其他蛋白质甚至细菌都成功地固定在溶胶-凝胶（其中许多是光学透明材料）材料中。研究结果在多个发表的评论中已有描述和汇总[9~12]。

用溶胶-凝胶法来包埋生物分子一个最重要的方面是，该方法可以定做，以便蛋白质不变性。也就是说，溶胶-凝胶包埋的生物分子保留其特征反应性和光谱性质。需要考虑的一些重要因素包括 pH、孔径大小和乙醇的存在。合成方案已成功地用于制造光学透明的，并具有生物活性的二氧化硅凝胶（图 3.4）。该方案包括：①将醇盐前体（S）与有稀酸（催化剂）的水混合；②通常在无醇条件下，用超声波处理混合物充分水解醇盐；③加入含有感兴趣生物分子的缓冲 pH 溶液；④将溶液制成所需的几何状和形状（整料或薄膜）。在这个方案中，乙醇浓度最小化，和掺入生物分子溶胶的 pH 升高到一个确保生物分子的生存的水平。

图 3.4 中介绍的合成方案，通常凝胶化出现在 2～30min。凝胶化时间取决于多种因素，包括缓冲液的离子强度，生物分子的浓度，加入的醇（或缺乏）和温度等因素。延长凝胶化时间，可以减少缓冲离子强度，降低生物分子浓度，添加乙醇，和（或）降低

温度。另一种延长凝胶化时间的方法是引入添加剂，如聚乙二醇（PEG）或聚乙烯醇。用正硅酸甲酯前体（TMOS）和生物缓冲剂以几十分钟甚至几小时，通过改变合成条件合成溶胶的方法，我们已成功地延长了凝胶化的时间。凝胶化后聚缩合继续，凝胶网络增加机械稳定性和强度。将材料存储在密封容器中，很容易使溶胶-凝胶材料保持湿凝胶状态，使得孔隙液体不会蒸发。如果想得到干凝胶，缓慢地蒸发以防止基质干裂。

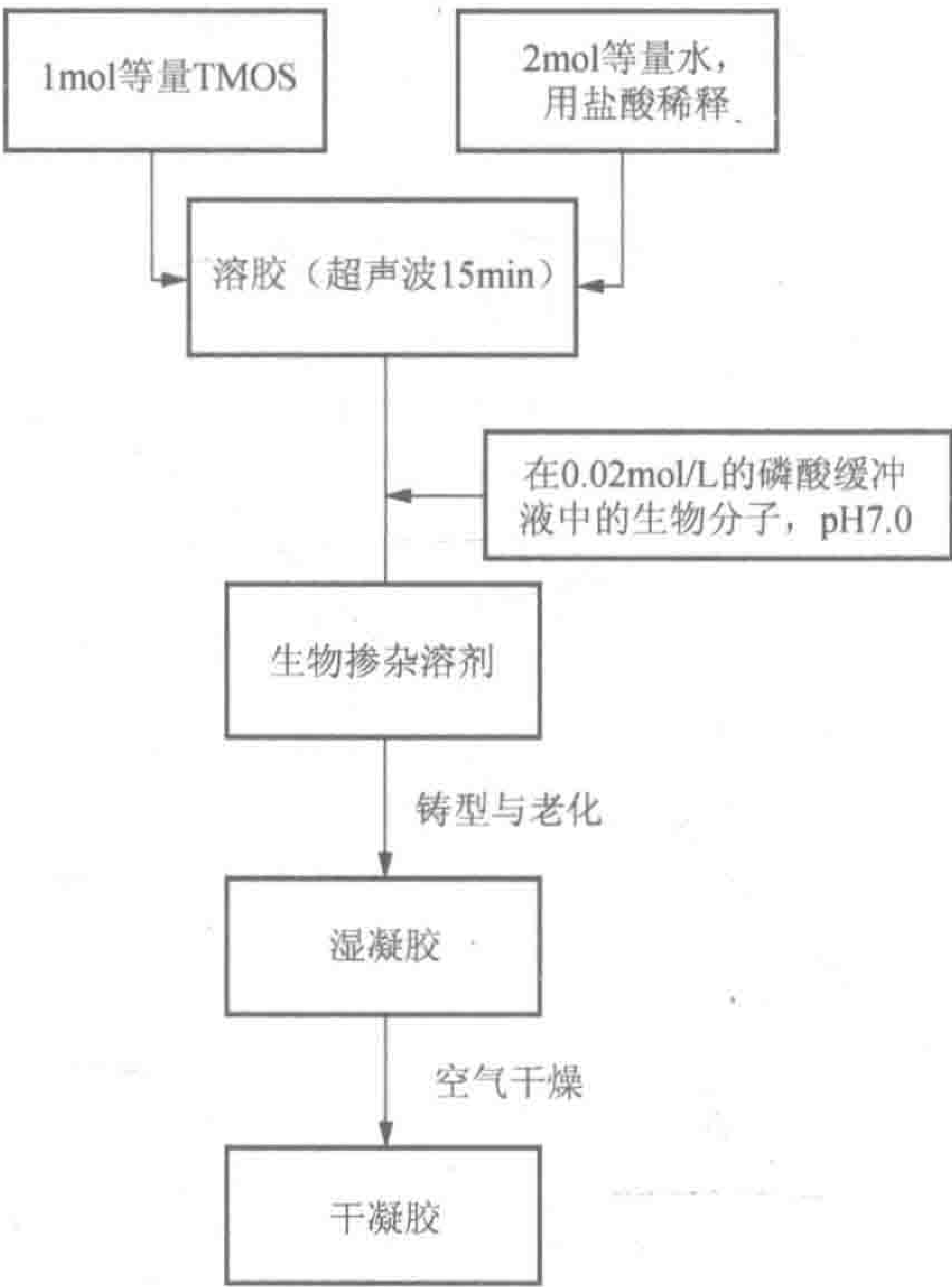


图 3.4　生物分子在透明的溶胶-凝胶二氧化硅玻璃中固定化合成计划。TMOS=正硅酸甲酯或四甲氧基硅烷

3.3　溶胶-凝胶包埋生物分子的稳定性

溶胶-凝胶固定化最重要的优势之一是包埋有稳定生物分子的能力[13~17]。间接证据表明，溶胶-凝胶的水解和缩合反应期间，生物分子在它周围以形成硅酸盐网状物的形式设计自身特定的细孔[15]。有一种硅酸盐“笼”，即根据生物分子的大小和形状要求限定的孔。因此，生物分子可以防止其周围的细孔塌陷，而基质防止生物分子展开和聚集。此外，基质可以防止与蛋白酶或微生物的接触。在接下来的章节中，我们总结溶胶-凝胶固定化后，增强生物分子的热、储存和化学稳定性。

3.3.1 热稳定性

溶胶-凝胶包埋方法使热稳定性显著改善，观察了 3 个黄素氧化酶：葡萄糖氧化酶、乳酸氧化酶（LOX）和乙醇酸氧化酶（GLyOX）[13]。当用于凝胶包埋时，较小尺寸的孔有可能增强硅酸盐和蛋白质之间的静电作用，有报道认为固定化可稳定葡萄糖氧化酶。稳定的程度令人印象深刻，相比酶在 63℃水中与在溶胶-凝胶包埋中半衰期增加了 200 倍。有趣的是，经溶胶-凝胶包埋的 LOX 和 GLyOX 在 400nm 的吸光率最初不稳定。这 3 个氧化酶有不同的等电点：葡萄糖氧化酶为 3.8，乳酸氧化酶为 4.6，乙醇酸脱氢酶为 9.6。很显然，这种酶和带电硅酸盐基质之间静电相互作用引起不稳定，因为如果酶与溶胶-凝胶固定化前期静电结合，LOX 和 GLyOX 经历了稳定性的显著改善。一旦形成静电复合体，与酶在水中比较，酶在 63℃的半衰期，LOX 经历 150 倍的增长，GLyOX 增加了 100 倍[13]。这些研究结果表明增加的稳定性的益处是包埋产生的，然而，他们也强调生物分子与溶胶-凝胶衍生的基质的高电荷表面之间的静电相互作用的重要性。

在血红素蛋白细胞色素 c 中也观察到增加热稳定性[15]。溶液中蛋白质热诱导的伸展，一般情况下，显示出超越小温度范围内急剧的过渡，一半的分子变性的过渡点称为 T_m 值。用血红素邵氏带的光吸收监测细胞色素 c 为无折叠。如图 3.5 所示，液体缓冲液中的细胞色素 c 的 T_m 大约为 65℃，而溶胶-凝胶基质中的细胞色素 c 的 T_m 至少为 90℃。可能是溶胶-凝胶包埋的细胞色素 c 稳定超过 90℃，因为缓冲液煮沸导致凝胶裂解是在 95℃。

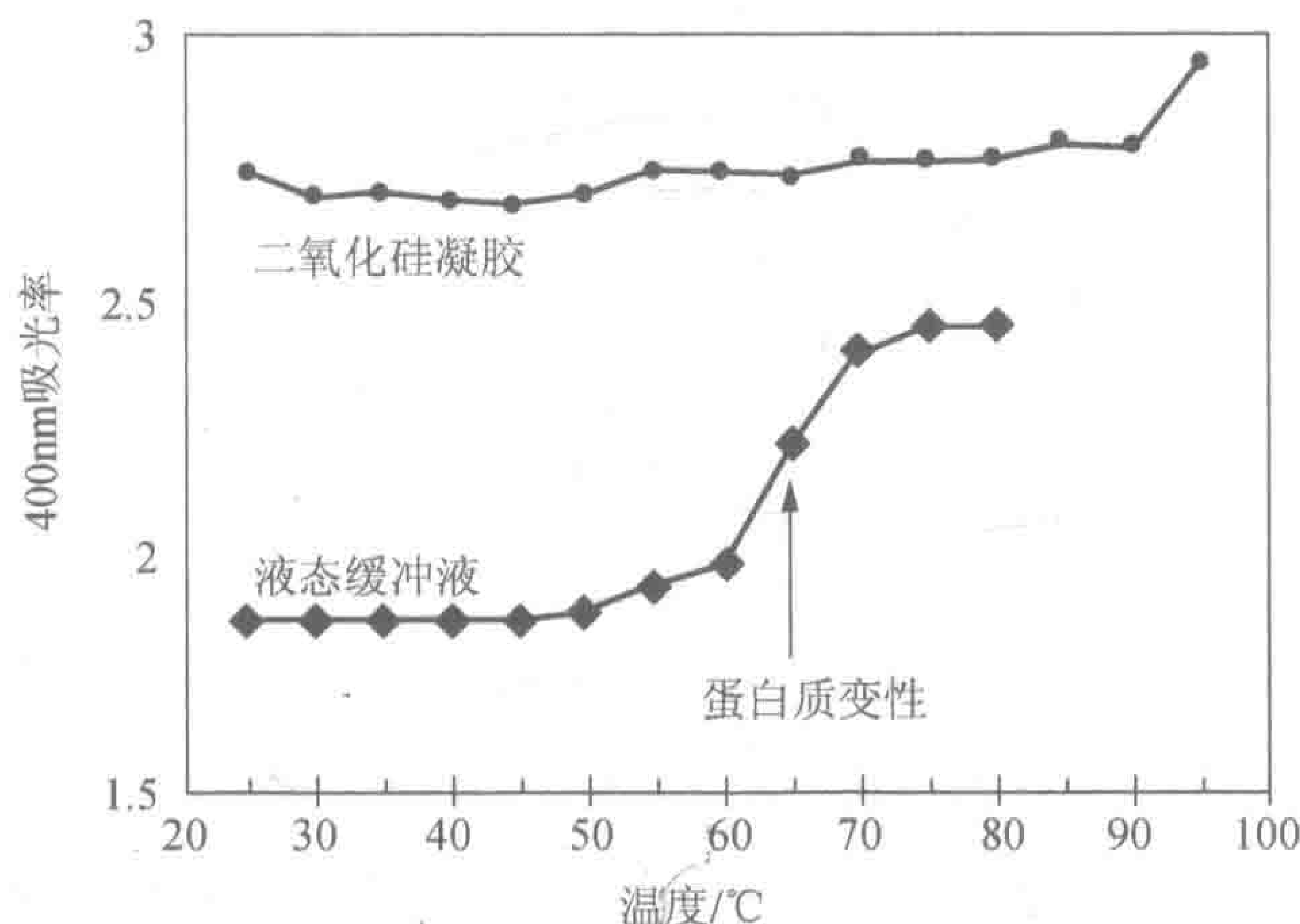


图 3.5　液体缓冲液和在湿硅凝胶中细胞色素 c 热变性，像溶胶-凝胶包埋结果一样显示热稳定性有明显改善。转变温度，在液体缓冲液中 T_m 大约为 65℃，但在湿凝胶中 T_m 至少 90℃（转载自参考文献[15]并征得许可）

3.3.2　贮存稳定性

升高温度研究热稳定性，在室温或低于室温评价蛋白质和酶的贮存稳定性。在胆碱酯酶的实验中，溶胶-凝胶固定化酶保留酶活性显著高于酶在缓冲液中的活性。图 3.6 显示丁酰胆碱酯酶作为功能活性贮存时间为 4℃。如图 3.6 所示，溶胶-凝胶包埋的酶贮存 40 天后几乎没有损失活性，而在溶液中的酶，在同样贮存期酶活性稳步下降。

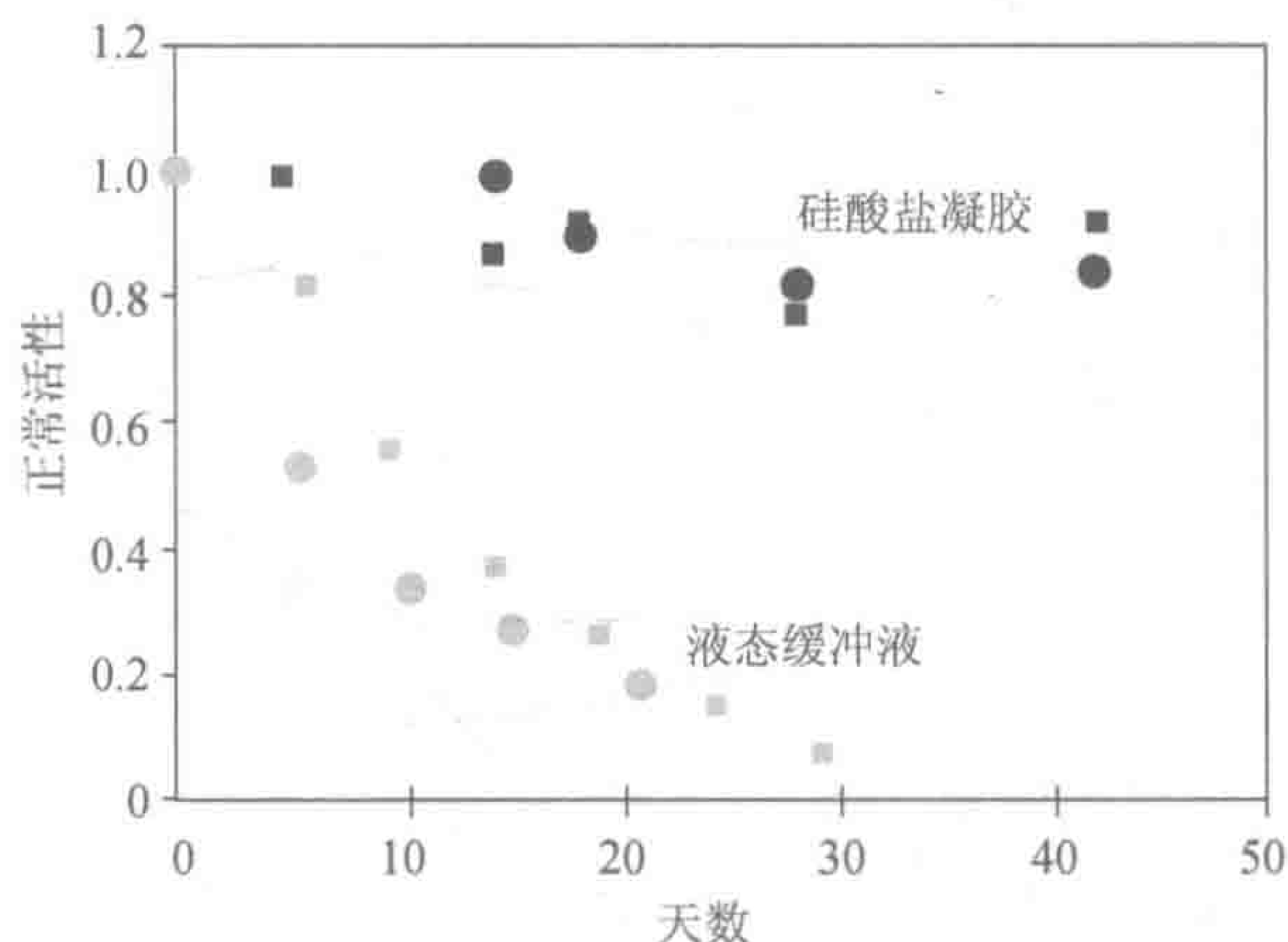


图 3.6　在 4℃丁酰胆碱酯酶作为正常酶活性贮存函数表明，在溶胶中固定化酶保留的活性远远好于游离酶（酶在缓冲液中）的活性

3.3.3　化学稳定性

化学稳定性也可以改善。有研究表明，通过溶胶-凝胶法固定化抗体，与传统表面附着相比较，能更好地保留抗体与抗原结合能力。放在 0.01mol/L HCl 中（pH 约 2.0）24h 之后，溶胶-凝胶包埋的抗结核（抗 TNT）抗体不会损失抗结核结合的能力，而经传统的表面附着固定化抗体则损失＞30%[16]。

醇中细胞色素 c 的化学稳定性结果表明，有小于 60%体积甲醇（MeOH）缓冲液中血红素蛋白部分发生变性（不折叠），随甲醇量增加而变性程度增加。而且，在浓度大于 60%体积甲醇（MeOH）中，依赖缓冲液出现沉淀。然而，包埋在硅酸盐凝胶中时，由于甲醇变性的蛋白质完全可逆；当样品浸泡到纯缓冲液时，蛋白质还原到天然形式。而且，溶胶-凝胶固定化蛋白质，甚至将凝胶浸泡在纯甲醇缓冲液中几星期，也不会出现蛋白质聚集[18]。结果证实，在基质孔隙中隔离的生物分子可防止聚集，至少部分约束蛋白质的移动。

3.3.4　其他注意事项

综合结果表明，至少在某些蛋白质和酶中，溶胶-凝胶包埋已经导致了稳定性明显改善。虽然在基质孔中生物分子的隔离能防止蛋白质聚集，即一种已知的变性途径，但确

切的机制尚不清楚[19]。此外，基质可以保护蛋白质的折叠。已经表明，溶胶-凝胶基质中的添加剂有助于稳定包埋的生物分子。例如，聚乙二醇加入到溶胶-凝胶基质中可增强脂酶的活性[20]、胰蛋白酶和酸性磷酸酶[21]的半衰期。然而，如果选择了溶胶-凝胶途径就必须认真考虑。首先是生物分子间的静电相互作用，特别是它的“活性位点”和硅酸盐基质，因为两者都可能高度带电荷。另一个考虑是，由于扩散限制，观察到的反应速率可能较低。最后，根据固定化生物分子的大小，蛋白质拥挤的影响，可能会导致该蛋白质的构象[22]不稳定。

3.4　溶胶-凝胶包埋稳定性研究：肌酸激酶

这里，我们以溶胶-凝胶直接包埋的稳定性为例。肌酸激酶（CK）是一个细胞热力学中的关键酶。它以氢键结合在一起的二聚体而存在，总摩尔质量为 82kDa。酶催化以下反应：



$$\text{磷酸肌酸} + \text{ADP} \xrightleftharpoons{\text{CK}} \text{肌酸} + \text{ATP} \tag{3.1}$$

为了监测酶活性（反应速度），直接测量腺苷三磷酸（ATP）的生成是非常困难的。作为替代方案，ATP 的产生可以通过已糖激酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（G-6-P 脱氢酶）偶联酶反应来测定，如下面的反应所示：



$$\text{ATP} + \text{葡萄糖} \xrightleftharpoons{\text{已糖激酶}} \text{葡萄糖-6-磷酸} + \text{ADP} \tag{3.2}$$



$$\text{葡萄糖-6-磷酸} + \text{NADP}^+ \xrightleftharpoons{\text{G-6-P脱氢酶}} \text{葡萄糖-6-磷酸盐} + \text{NADPH} \tag{3.3}$$

这三个反应偶联时，形成 NADPH 的速率与形成 ATP 的线性速率成正比。NADPH 的浓度通过其 340nm 处吸光度进行测定。肌酸激酶活性实验中，肌酸激酶是溶胶-凝胶二氧化硅基质固定化的唯一组件。然后，掺入 CK 固体凝胶浸泡在含有所需底物磷酸肌酸、葡萄糖、腺苷 5′-二磷酸（ADP）和 $NADP^+$的液体缓冲液中，还需要已糖激酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和硫醇活化剂、*N*-乙酰半胱氨酸。结果表明，肌酸激酶由于包埋在溶胶-凝胶二氧化硅中而稳定，但异常的温度会影响它的活性[17]。这些特征下一节讨论。

3.4.1　在室温下长期贮存

将制备的固定化肌酸激酶硅凝胶室温下，贮存于近中性 pH 缓冲液中可长达 6 个月。作为对照，肌酸激酶缓冲液也在相同条件下存储。如图 3.7 所示，与缓冲液相比，酶在溶胶-凝胶基质中的相对活性较稳定。在溶胶-凝胶整料和在溶液中的活性是标准化初始速率。如图 3.7 所示，5 个月后，包埋的酶保留 90%的活性。此后，活性开始下降，6 个月后下降到最大值的 50%。与此相反，室温下仅贮存 10 天，对照缓冲液的酶活性降至其原来的 50%。

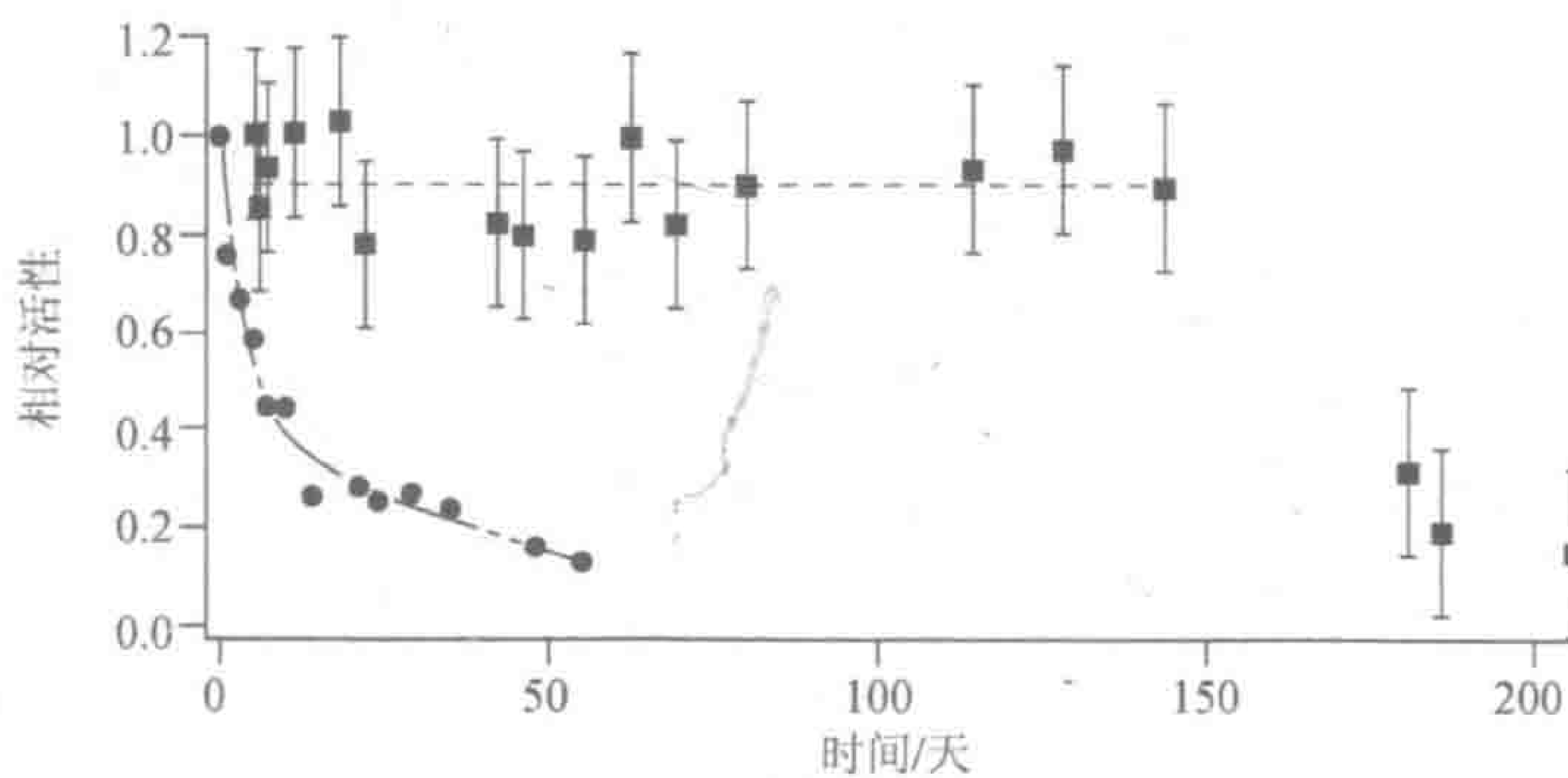


图 3.7　室温 pH 7.0 时在 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液（●）和溶胶-凝胶二氧化硅（■）中肌酸激酶的相对活性表明，溶胶-凝胶包埋增强了贮存稳定性。溶液和溶胶-凝胶每毫克酶的最大活性分别为 0.2 和 7×10^{-5}（转载自参考文献[17]并征得许可）

3.4.2　高温和加热对酶活性的影响

将溶胶-凝胶中和在缓冲液中肌酸激酶在 37℃、47℃和 60℃贮存不同时间来评价酶稳定性。在温度升高的情况下，整料和溶液两种材料中，随着温度升高肌酸激酶的活性很快损失。但是，溶胶-凝胶包埋的肌酸激酶比溶液中的肌酸激酶活性在所有温度下均更高。例如，在 60℃ 1h 后，没有观察到溶液中肌酸激酶活性，而溶胶-凝胶固定化酶加热 5h 后仍保留 50%的活性。同样，在 47℃约 1 天，溶液中的活性下降为零，而溶胶-凝胶固定化的酶加热 5 天后仍保留活性的 50%。此外，12 天后仍维持最大活性的 50%。图 3.8 显示加热 47℃后，溶胶-凝胶整料和缓冲液中肌酸激酶活性的比较。

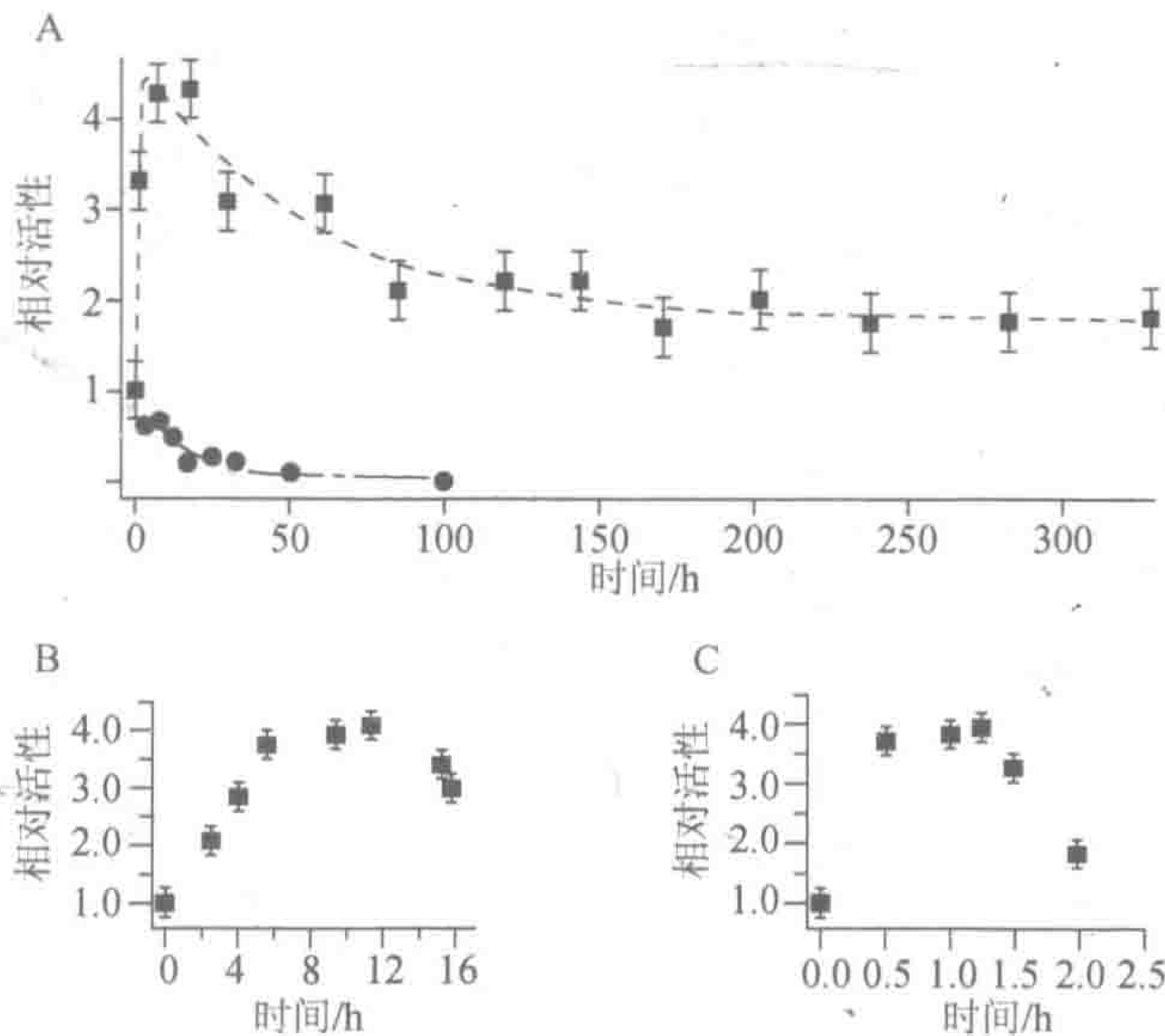


图 3.8　（A）在溶液中加热至 47℃（●）和在溶胶-凝胶二氧化硅（■）相对活性表明，在溶液中的活性立即降低，但在溶胶-凝胶二氧化硅的活性降低之前增加了。（B）47℃热处理掺入肌酸激酶湿润硅胶中活性对时间的函数。（C）60℃热处理掺入肌酸激酶湿润硅胶的活性对时间的函数（转载参考文献[17]并征得许可）

一个与众不同和意想不到的观察结果是，溶胶-凝胶整料中的肌酸激酶加热显示活性急剧上升，随后逐渐下降。在所有的高温下（即 37℃、47℃和 60℃）也观察到该现象。图 3.8 显示热处理增加活性的结果。活性增强表观活化能为（2.6±0.6）kJ/mol。热处理的结果使活性通常增加了约 4 倍。注意，加热缓冲液中的酶不会引起活性的增加，而是造成立即降低。

溶胶-凝胶整料的孔平均尺寸是使用氮气吸附和解吸附等温线来测定。孔径、孔体积和表面积并作为温度函数列于表 3.1。有相对窄的孔径分布，其中 80%的孔容积在平均孔大小为±10%。氮吸附和解吸附数据表明硅基质中存在热诱导变化。孔径增加作为温度的函数，它提供了基于材料热处理样品增加的酶活性的解释。大孔径中酶能够重新排列成更理想的构象。在溶胶-凝胶整料的合成中几分钟发生凝胶化。虽然该材料经历一个液体-固体转化成凝胶化，但缩聚继续发生。随着酶周围基质的形成，酶分子不可能以天然状态存在。通过扩大孔径，更有利于酶的重排。然而，如果升温时间延长，会诱导酶变性，导致活性的降低。因此，有两个相对的效应可以解释为什么初始活性随短期加热而活性增加，长期加热活性降低。

表 3.1　溶胶-凝胶加热作用孔径大小

加热条件	平均孔径/nm	孔体积/（m^2/g）	表面积/（m^2/g）
室温	8.3	2.0	900
37℃, 3h	8.8	1.9	780
47℃, 3h	9.3	2.2	800
60℃, 3h	10.9	2.2	730

用圆二色光谱（CD）监测肌酸激酶结构变化和维护结构完整。圆二色利用圆偏振光探测蛋白质的二级结构（α-螺旋和β-折叠）。对构象变化敏感的圆二色光谱是用于研究蛋白质结构的常用分光光度法[23]。加热或不加热处理获得的缓冲液和溶胶-凝胶材料中肌酸激酶的圆二色光谱显示在图 3.9[17]。在缓冲液中酶的圆二色光谱表示，最低在 220nm 测出的无限制酶天然状态性质。溶胶-凝胶（无热处理）包埋酶的圆二色光谱出现在最低 225nm 处，提示大部分酶处于不同的、非天然的构象状态。然而，37℃、47℃或 60℃加热 3h，最小圆二色光谱恢复到 220nm。从这些结果我们知道，加热时，包埋的酶是能够恢复到天然构象（即酶的二级结构变得更像是在溶液中的酶）。使酶的结构更接近天然状态可能说明为什么初始增加酶的活性。

在第二组实验中，我们通过在 220nm（特性波长）作为温度函数监控椭圆率变化监测肌酸激酶的热过渡。椭圆率是α-螺旋情形的指标，通过增加椭圆率表示蛋白质解折叠。如图 3.10 所示[17]，加热该整料和溶液至 90℃，包埋的酶没有像溶液中的酶那样完全变性。不折叠过渡的中点温，称为 T_m 值，溶液中肌酸激酶为 75℃，而溶胶-凝胶整料测不出 T_m 值，因为酶没有完全展开。换句话说，溶胶-凝胶固定化的肌酸激酶未展开到像溶液中一样的程度。当温度冷却至 20℃时，实际上椭圆率没有变化，表明在这两种情况下蛋白质解折叠是不可逆的。然而，这些结果清楚地表明，当在溶胶-凝胶基质的孔固定化时，酶能够更好地承受热变性。

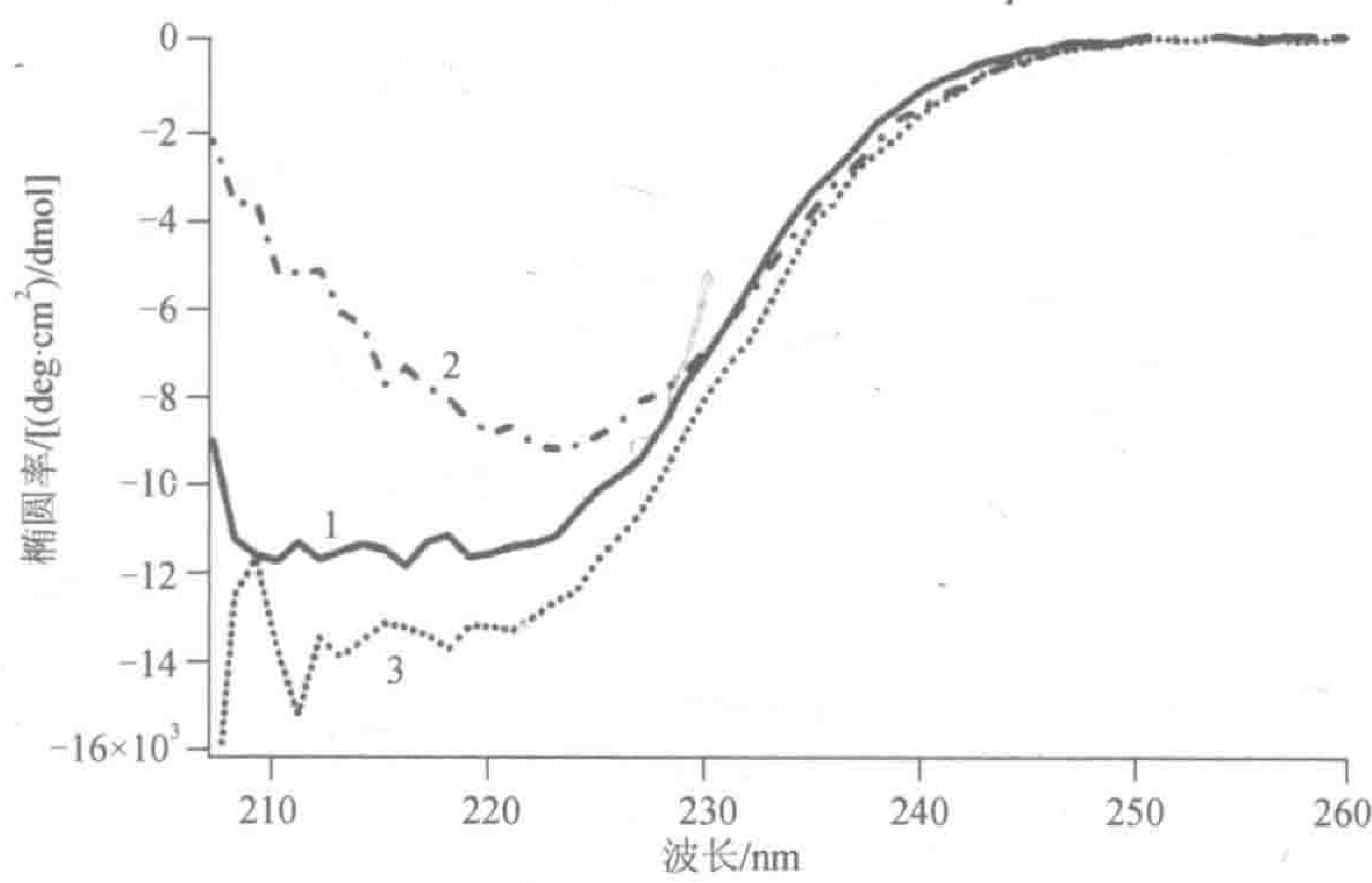


图 3.9　肌酸激酶在（1）刚制成的溶液中，（2）未加热的溶胶-凝胶二氧化硅整料中，（3）47℃加热 3h 的圆二色光谱。该光谱表明刚包埋限制的酶以非天然构象存在，但加热 3h 后，酶的构像变得更像游离酶（酶在溶液中）（转载自参考文献[17]并征得许可）

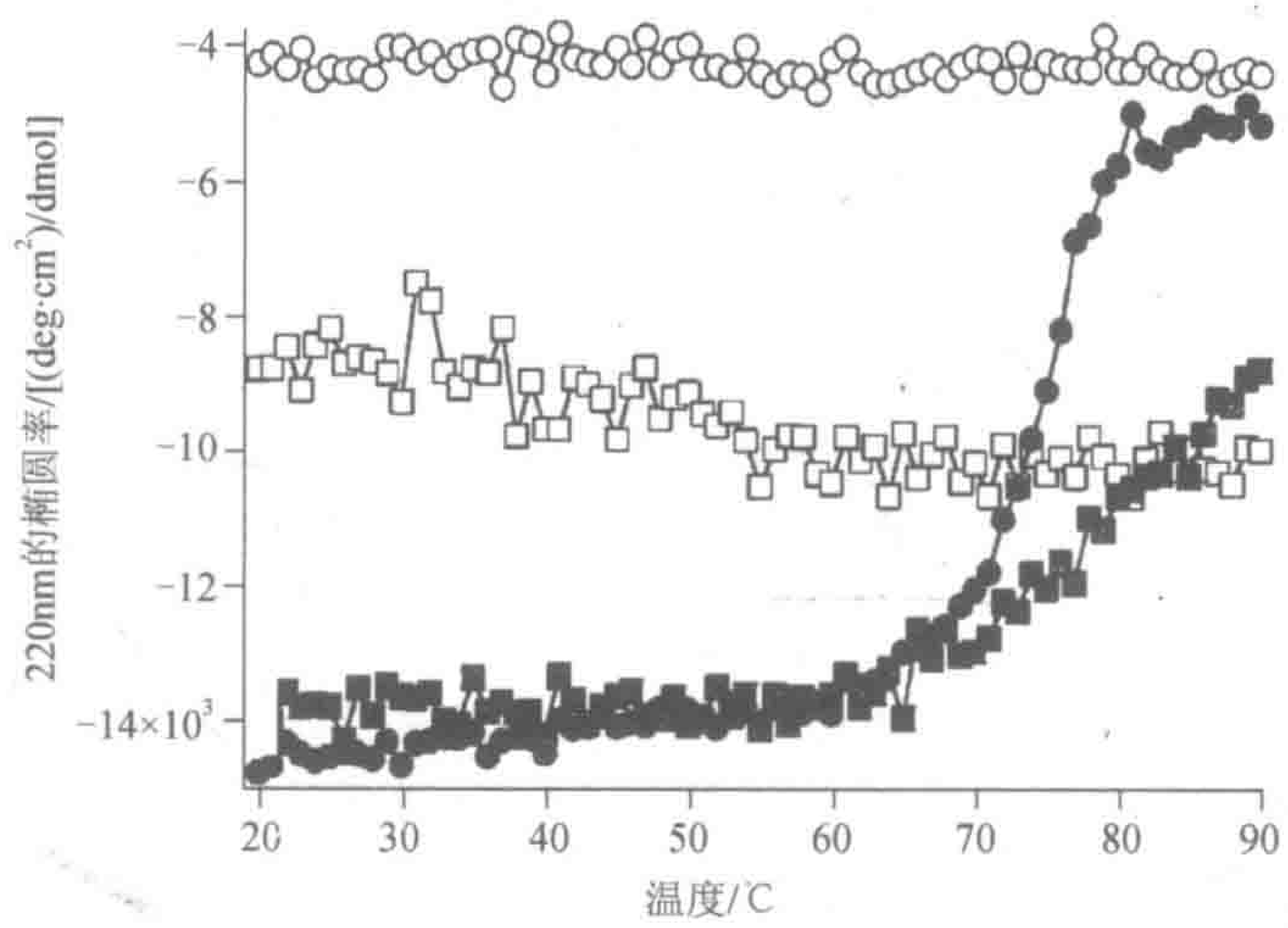


图 3.10　凝胶中和溶液中肌酸激酶在 220nm 监测热解折叠过渡：（●）在加热过程中的溶液；（○）在冷却过程中的解决方案；（■）溶胶-凝胶加热期间；（□）在冷却过程中溶胶-凝胶。与游离酶（酶在溶液中）比较溶胶-凝胶包埋的酶只有少量展开，但两种情况下，变性是不可逆的。样品以 2℃/min 从 20℃加热至 90℃，然后从 90℃冷却至 20℃（转载自参考文献[17]并征得许可）

3.4.3　基质-酶表面相互作用

肌酸激酶工作体表明，酶可作为溶胶-凝胶制备过程中的孔模板，即凝胶化过程中形成的酶周围的基质。根据用溶胶-凝胶固定化稳定肌酸激酶的机制，人们合理假设，酶和二氧化硅基质之间存在有益的相互作用。肌酸激酶的外表面含有比负电荷更多的正电荷补丁，如电子密度预测的一样[24]。溶胶-凝胶二氧化硅浸渍在近中性 pH 的缓冲液中时，二氧化硅壁是带负电荷，因为二氧化硅的等电点约为 2 [4]。因此，二氧化硅基质表面与酶的表面之间的静电吸引和预期的一致。虽然肌酸激酶的外表面有利于与基质相互作用，

但酶的活性位点则没有相互作用。肌酸激酶活性位点被嵌入到酶内部，并不经历与二氧化硅相互作用。重要的是活性位点没有被改变或阻断以保持最大的酶活性。酶-孔壁的静电相互作用引起了外部结构稳定性的组合，空间上与表面分离的酶分子裂缝中的活性位点缺乏明显的扰动，导致生物物质的稳定和活化[17]。

3.5　溶胶-凝胶基质中光化学辅酶再生

对于许多酶来说，辅因子（也称为辅酶）是必需的，而且是脱氢酶真正需要的，它需要 NAD 或 NADP 作为辅因子[式（3.4）]：



$$\text{脱氢酶还原底物} + NAD(P)^{+} \xrightleftharpoons{\text{脱氢酶}} \text{氧化底物} + NADP(H) + H^{+} \tag{3.4}$$

在光学传感测定中，脱氢酶活性能方便测定，因为辅酶、NADH 或 NADPH 的还原形式会发出荧光。然而，根据该反应，如果没有辅酶的继续供给传感器不可能连续工作。在最近的工作我们已经证明，光氧化剂可掺入溶胶-凝胶基质中伴随着酶和辅因子，以通过氧化还原辅因子而再生[25]。有机染料硫堇选定为光氧化剂，因为它在二氧化硅基质中稳定，保持激发态属性，并且与其他组分相容和不起化学反应。

硫堇（$thio^{+}$）可见光范围内吸收光为 λ_{max}=596nm[式（3.5）]。在溶液中，激发的硫堇（$^{*}thio^{+}$）氧化的 NADH[式（3.6）]。随着 NADH 被氧化，激发硫堇发射的荧光被猝灭。所以，用可见光（596nm）激发硫堇（$thio^{+}$），有可能再生 NAD^{+}。



$$thio^{+} + h\nu_{596nm} \xrightarrow{k_a} {}^{*}thio^{+} \tag{3.5}$$



$$^{*}thio^{+} + NADH \xrightarrow{k_q} thio + NAD^{+} \tag{3.6}$$

异柠檬酸脱氢酶（ICDH）作为本研究脱氢酶模式，由于 ICDH 反应的吉布斯自由能强烈有利于异柠檬酸的氧化，从而减少后反应[26]的实验困难。$NADP^{+}$作为电子受体，ICDH 催化异柠檬酸氧化成α-酮戊二酸[式（3.7）]：



$$\text{异柠檬酸} + NADP^{+} \xrightarrow{ICDH} \alpha\text{-酮戊二酸} + CO_2 + NADPH + H^{+} \tag{3.7}$$

通过硫堇与异柠檬酸脱氢酶反应耦合，NADPH 光化学氧化如图 3.11 所示。

我们首先确定 NADPH 经历了与 NADH 和硫堇一样的反应，反应中硫堇的荧光被猝灭，就像它氧化 NADPH 一样[式（3.6）]。证明硫堇荧光发射光谱，在缓冲液中和包埋在湿二氧化硅凝胶中基本上没有差别，表明硫堇光氧化剂本身的光学性质，像包埋的结果一样没有改变。当 NADPH 掺入到二氧化硅凝胶和 NADPH 缓冲液，暴露于激发的硫堇中时，可观察到凝胶和溶液中荧光猝灭过程。图 3.12 显示了 NADPH 浓度，表示 NADPH 初始浓度的百分比，随时间推移激发的硫堇（$^{*}thio^{+}$）的存在情况。NADPH 的氧化作用通过衰减常数表示，$k_{\text{氧化}}$和 NADPH 的氧化速率在溶胶-凝胶基质中大约低一个数量级。溶胶-凝胶二氧化硅的 $k_{\text{氧化}}$为 $8.8(\pm1.0)\times10^{-4}s^{-1}$，缓冲液的 $k_{\text{氧化}}$为 $9.8(\pm2.9)\times10^{-3}s^{-1}$。在溶胶-凝胶材料观察到的较慢速率可以通过质量传递的限制来解释。

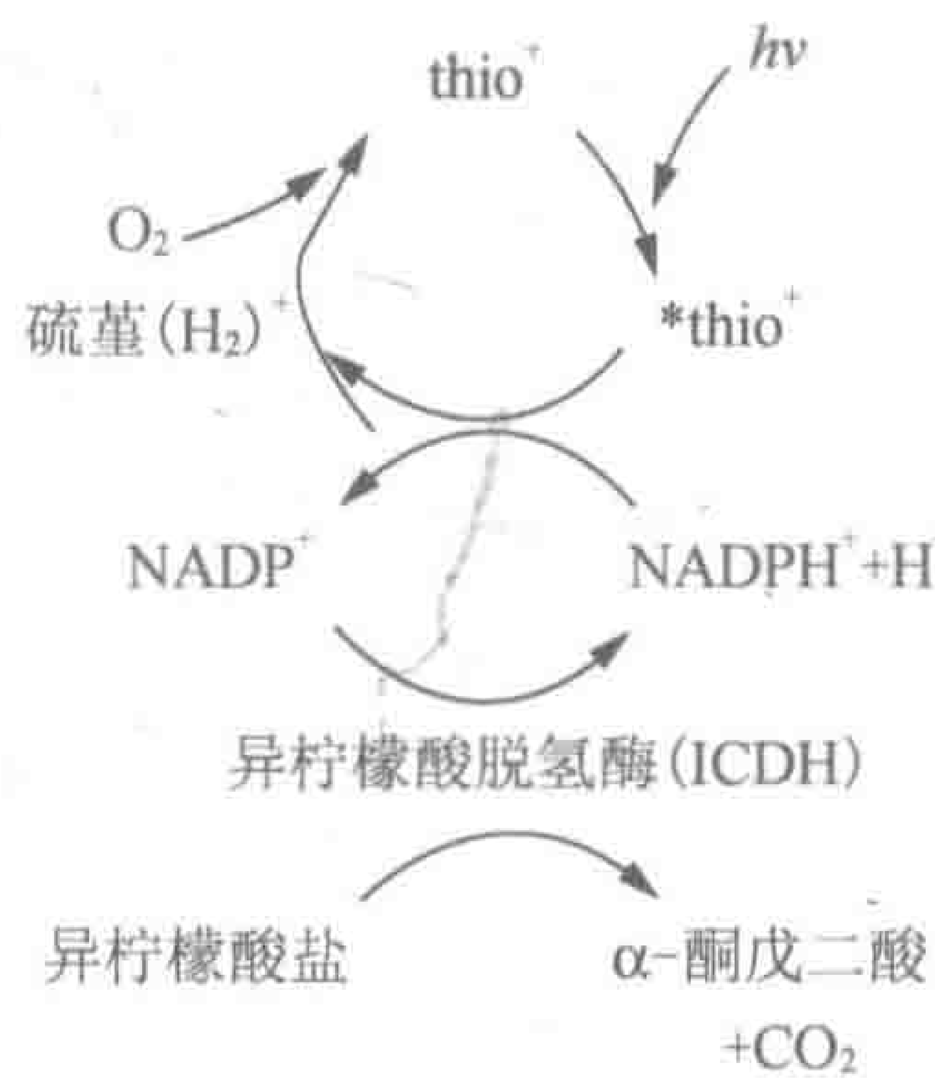


图 3.11　异柠檬酸连续氧化酶辅因子再生。通过硫堇与异柠檬酸脱氢酶催化的异柠檬酸酶促氧化耦合，NADPH 的光化学氧化。当硫堇被激发，它与 NADPH 反应形成 $NADP^+$。再生 $NADP^+$用于另一个异柠檬酸的氧化（转载自参考文献[25]并征得许可）

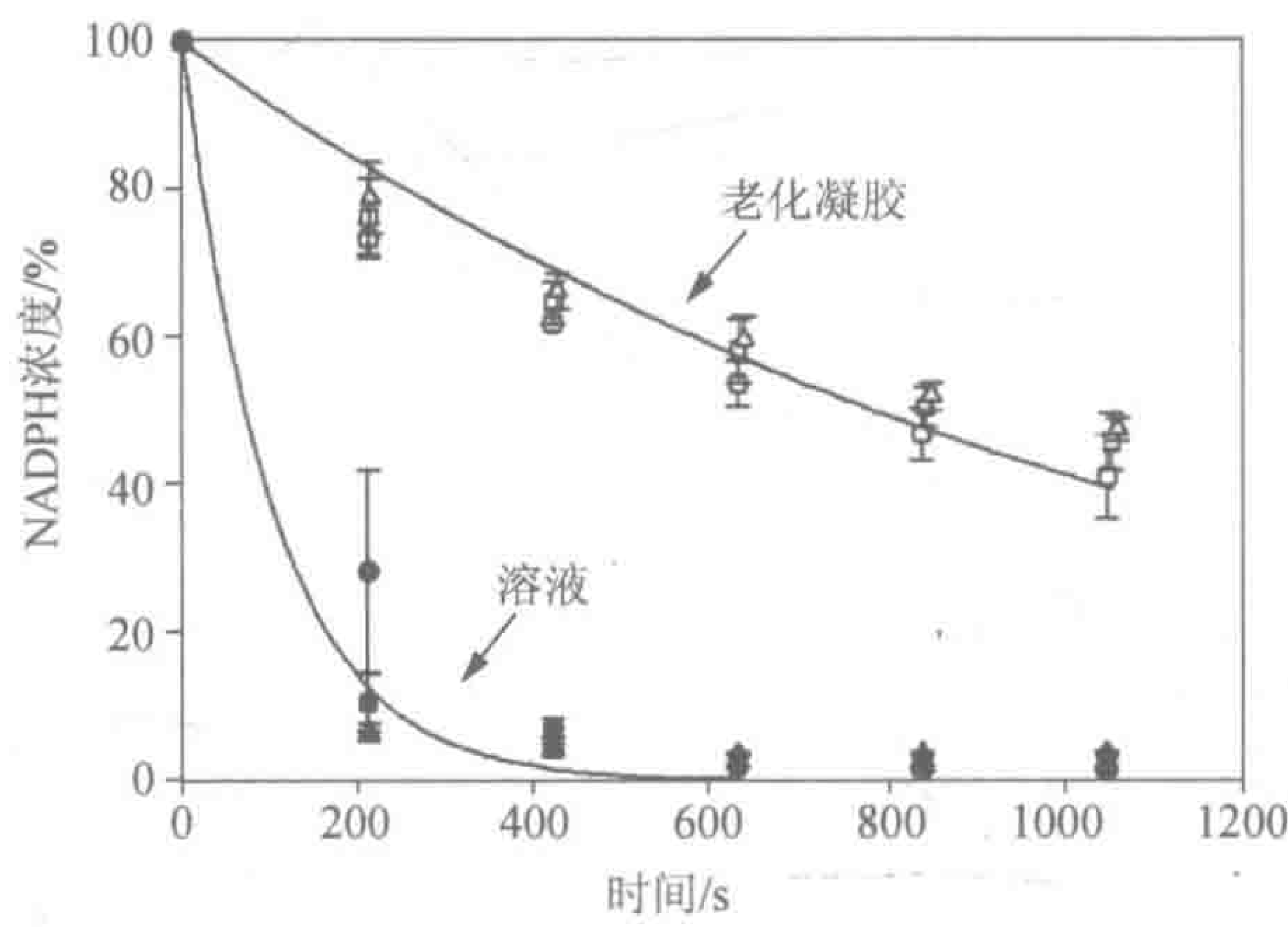


图 3.12　暴露于激发硫堇在缓冲液中和在二氧化硅湿凝胶中时 NADPH 的消失。NADPH 浓度表示为 0 时间 NADPH 初始浓度百分比。白色符号显示 NADPH 在湿凝胶中的减少，黑色符号显示 NADPH 在溶液中的减少。三种起始浓度 NADPH 用于每个样品中：(○) 湿凝胶，120μmol/L NADPH；(□) 湿凝胶，80μmol/L NADPH；(△) 湿凝胶，40μmol/L；(●) 缓冲液，120μmol/L NADPH；(■) 缓冲液，80μmol/L NADPH；(▲)缓冲液，40μmol/L NADPH。六个条件中的数据分别适合单指数衰减，$y=100e^{-bt}$。衰减参数 b，湿凝胶和溶液样品分别是 $8.8(\pm1.0)\times10^{-4}s^{-1}$ 和 $9.8(\pm2.9)\times10^{-3}s^{-1}$（转载自参考文献[25]并征得许可）

NADPH 固定在凝胶中，而硫堇要在 0 时间加入，需要时间通过网络孔扩散。NADPH 的光化学氧化可与异柠檬酸脱氢酶催化的异柠檬酸氧化耦合（图 3.11)。异柠檬酸脱氢酶和硫堇在二氧化硅湿凝胶中共耦合并与 $NADP^+$一起孵育，然后按不同时间将异柠檬酸注入样品中。如图 3.13 所示，在每个进样的酶底物中，通过产生的 NADPH，即荧光的增加观测异柠檬酸脱氢酶的反应。当硫堇被激发后，NADPH 氧化，从而导致荧光的减少。此外，异柠檬酸脱氢酶促进 $NADP^+$还原成 NADPH，随后由硫堇对 NADPH 光化学氧化成 $NADP^+$，不断循环。我们作出的校准曲线与 NADPH 产生相一致，即与异柠檬酸浓度函数相关，该曲线基本上是线性的（图 3.14)。图 3.13 和图 3.14 数据证明，光氧化剂的确可以再生 NADPH 辅酶，光化学再生可能生物活化固态硅玻璃[25]。全部结果提示，能利

用的脱氢酶作为光学生物传感器，不会由于辅酶的耗尽而影响传感器功能的连续。

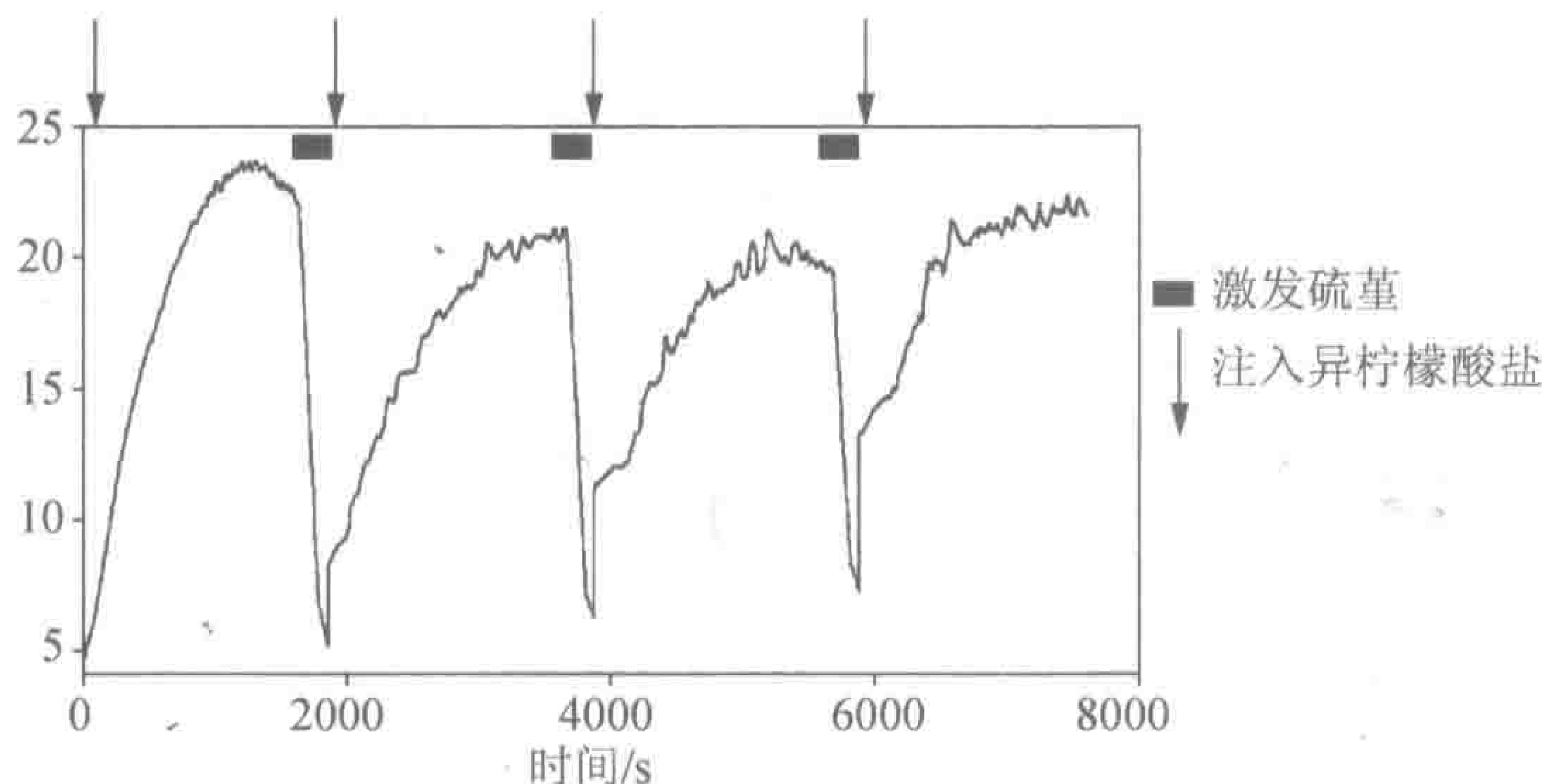


图 3.13　异柠檬酸脱氢酶在溶胶-凝胶二氧化硅中的重复反应。ICDH、硫堇和 $NADP^+$包埋在硅凝胶中，箭头表示异柠檬酸注入凝胶的不同时间。用 460nm 测定 NADPH 监测异柠檬酸的酶氧化作用。之后，硫堇被激发（以黑方块表示的时间）诱导 NADPH 氧化成 $NADP^+$。这个过程可以重复至少 4 个周期（转载自参考文献[25]并征得许可）

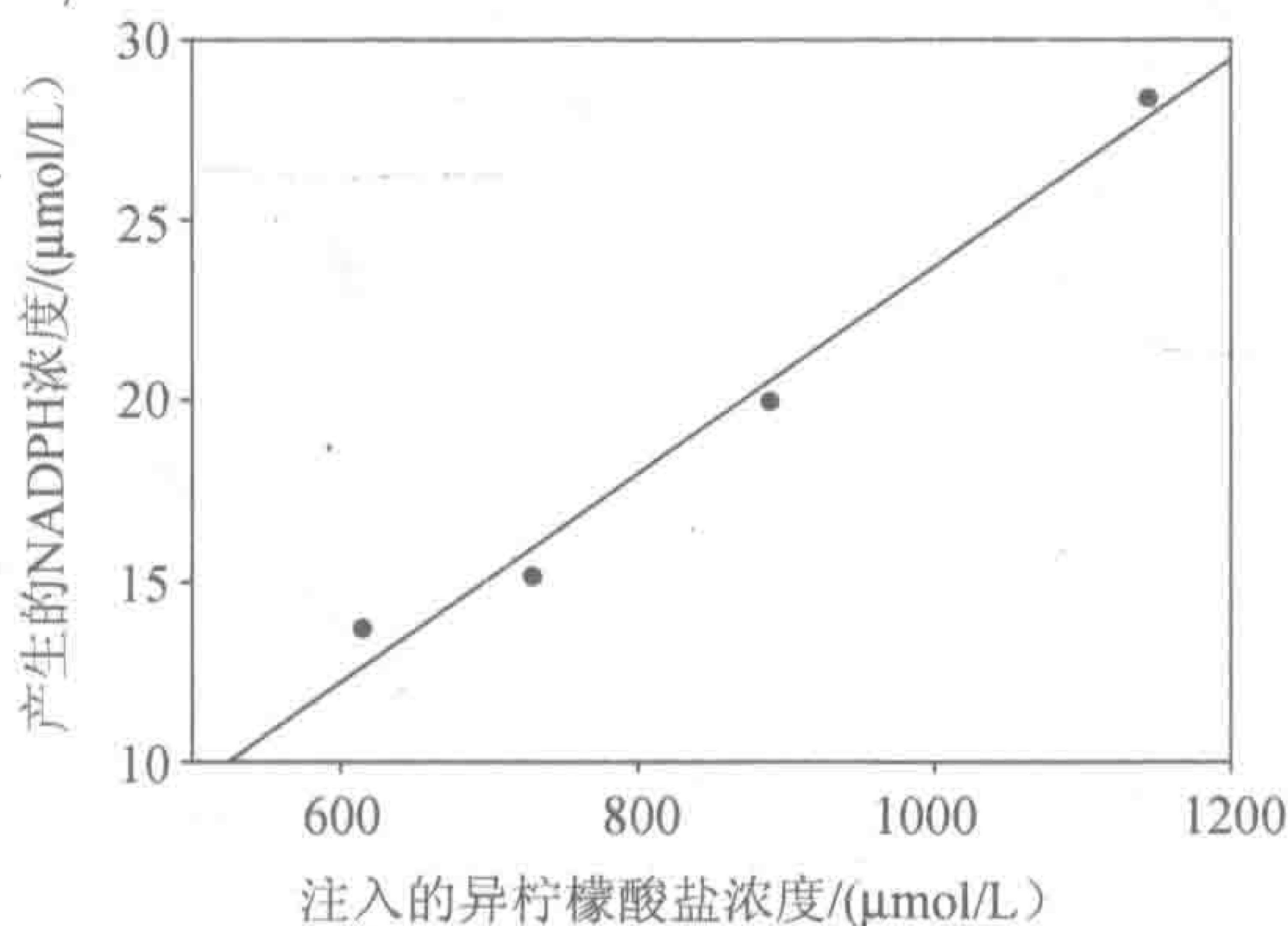


图 3.14　用相同异柠檬酸脱氢酶掺杂凝胶反复测量的校准曲线。每个周期中产生的最大 NADPH 浓度绘制为异柠檬酸浓度函数，可见到线性曲线（转载自参考文献[25]并征得许可）

3.6　生物活化溶胶-凝胶薄膜的生物传感元件

基于溶胶-凝胶材料作为传感元件的潜在用途，已成为这些材料热点研究的主题[27,28]。虽然可以使用整体，但对于生物传感应用，使用薄膜是首选。主要原因在于，薄膜可以减小靶分析物扩散长度，因此，大大减少响应时间，因为扩散距离随 $t^{1/2}$ 而变化。溶胶-凝胶基质具有孔的交联网络并呈现分析物扩散的曲折路径。对于薄膜来说，多孔性和孔径大小、扩散系数及反应时间之间有重要的相互作用[29]。

溶胶-凝胶薄膜通常沉积在浸渍涂层或旋涂层的基板上。浸渍涂布厚度一般由卷绕速度控制。制造的涂层具有优异光学透明性。此外，也可以在多种几何形状基质从平面基底到光纤进行浸涂。如果用旋涂，厚度可以使用旋转速度不断调整，膜具有优质的光学透明性。

具有功能性和活性生物分子高品质的溶胶-凝胶薄膜的制造并不烦琐。一般生物分子偏爱近中性 pH 和低乙醇的环境。在这些条件下，在溶胶-凝胶合成的缩合反应加速，导致迅速凝胶化。薄膜合成的主要因素是合理的胶凝时间，特别是浸涂过程。不仅要延长凝胶化时间，也降低了溶胶的黏度，最有效的手段之一是加入乙醇。大而细腻的蛋白质对乙醇特别敏感，但显然有些蛋白质（如抗体）仍保留其生物学功能。如果这些材料被大规模使用，制造可再生的具有均匀厚度的薄膜也是必要的。溶胶-凝胶涂层的一个优点是，通过与基片相匹配的涂层材料（如在二氧化硅基片上的二氧化硅涂层），可获得涂层和基体之间形成强附着力。

用固定化抗体，我们已经成功地制备了具有生物活性的薄膜。溶胶-凝胶基质包埋抗体已有广泛的研究[16,30~40]，尽管用薄膜只完成了有限工作。除了将甲醇加入到二氧化硅溶胶和缓冲蛋白质混合物中外，薄膜合成方案类似于整料合成。通过浸涂，薄膜沉积在玻璃基板上。我们用溶胶-凝胶二氧化硅薄膜包埋抗皮质醇抗体，在皮质醇免疫测定中使用的这些材料作为传感元件[41]。抗体掺入薄膜有优良的品质和光学透明度，“湿”态膜厚度约为 1μm，“干燥”状态的薄膜厚度大约 0.5μm。虽然可观的甲醇用于浸涂溶液（大约体积的 30%），但固定化抗体仍保留结合靶抗原（在这种情况下的皮质醇）能力。在实验中，用俄勒冈绿标记皮质醇的荧光光学检测抗体-抗原结合。俄勒冈绿是荧光素衍生物，在可见光区（分别为 495nm 和 527nm）经过激发和发射。如图 3.15 所示，在薄膜中恒定抗体浓度时，荧光信号随标记抗原浓度的增加而增加。此外，通过提高薄膜中的抗体浓度，可以得到更大的光信号。

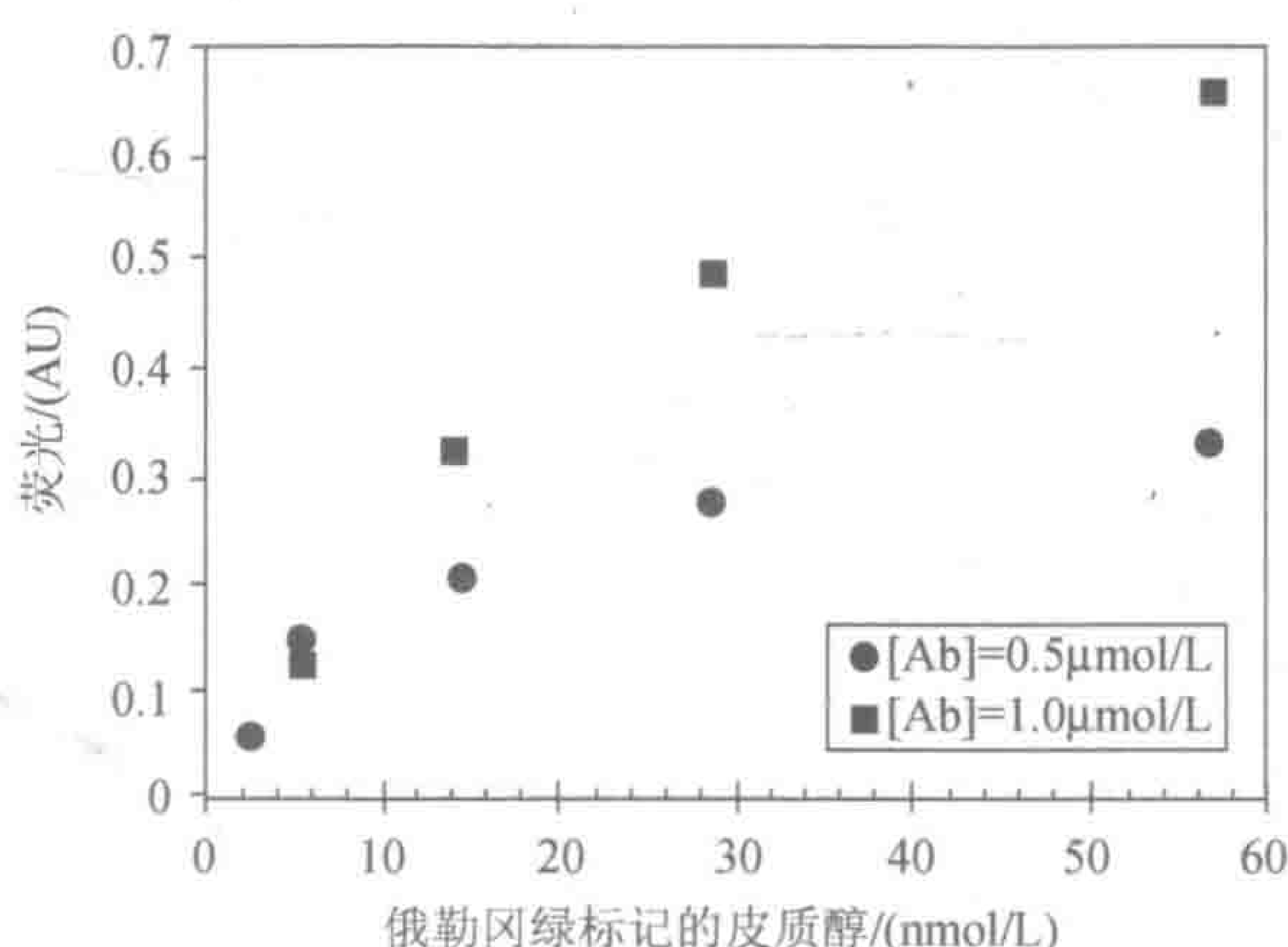


图 3.15 含 0.5μmol/L 或 1.0μmol/L 抗皮质醇抗体溶胶-凝胶二氧化硅薄膜的俄勒冈绿-皮质醇浓度系数为荧光信号。溶胶-凝胶包埋的抗体保留与抗原结合的能力，通过增加抗体浓度，可被获得更大的信号（转载自参考文献[41]并征得许可）

注意，所有的实验使用“湿”膜，其中孔径保持相对大。薄膜充分干燥时，没有观察到抗体-抗原结合。我们使用抗皮质醇掺入硅薄膜的竞争免疫测定皮质醇。在这些免疫测定法中，其中，标记和未标记抗原竞争固定数量抗体分子，所测信号随未标记的抗原浓度的对数而变化并且滑落到负数[42,43]。用抗皮质醇溶胶-凝胶薄膜展现出竞争免疫测定预期的行为；获得有负斜率的校正曲线（图 3.16）。此外，薄膜中高浓度抗体可获得更大的信号。

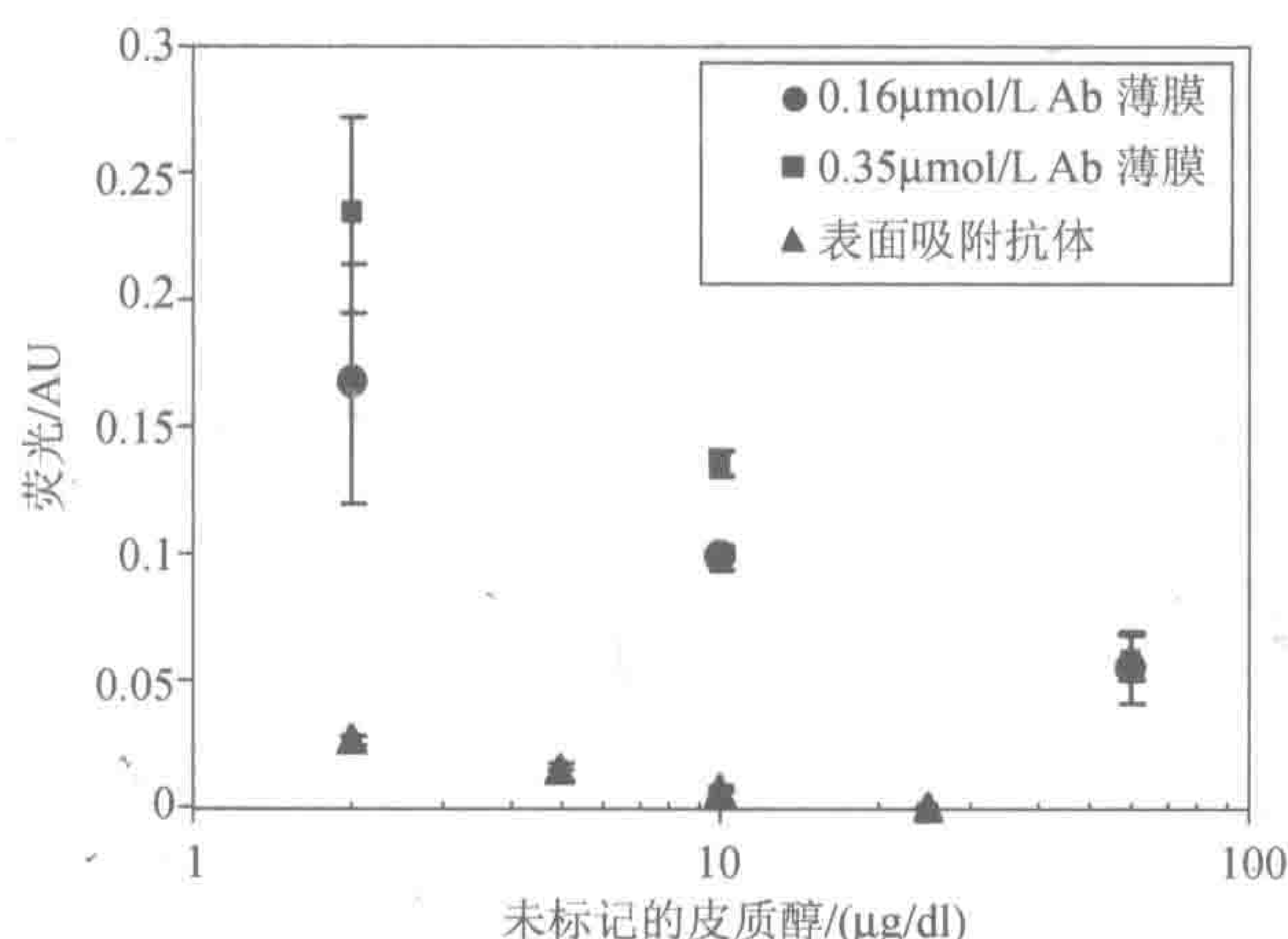


图 3.16　用含抗皮质醇溶胶-凝胶二氧化硅薄膜和与表面吸附抗皮质醇竞争性免疫分析的校正曲线。用溶胶-凝胶包埋，我们能够获得相当大的信号，因为每单位面积固定生物分子的数量大大高于传统的单层表面吸附（转载自参考文献[41]并征得许可）

当固定化生物分子时，溶胶-凝胶包埋的明显优势是有创建 3D 结构的能力。用传统的固定化方法，如表面吸附或共价附着，通常获得的是单层覆盖的生物分子。然而，用溶胶-凝胶包埋，由于生物活性材料的 3D 性质，每单位面积可获得大量生物分子。生物分子固定化的总数量取决于材料的厚度。通过比较溶胶-凝胶薄膜（约 1μm 厚）包埋和聚苯乙烯表面吸附抗皮质醇的竞争性免疫测定的结果来证明这种特性。如图 3.16 所示，溶胶-凝胶薄膜的荧光信号比表面吸附抗体测定的荧光信号高出 10 倍。

最后，薄膜对减少应答时间具有明显的优势。用抗皮质醇薄膜（约 1μm 厚）的免疫测定只需要温育 20min，实验表明，大约 10min 后（数据未显示）信号达到稳定。当类似的免疫测定法分别用抗皮质醇掺入的 1mm 厚二氧化硅整料来完成类似的免疫测定时，所需的孵育时间至少为 3h。因此，生物测定法，即薄膜远比整料更有效，因为分析物通过孔扩散的限制最小。

3.7　结　　论

在溶胶-凝胶衍生材料中，固定化生物分子大大增加了生物活性材料的多样性。柔性加工中固有的溶胶-凝胶合成和化学修饰能力，被认为是溶胶-凝胶方法，对生物传感器最有吸引力的平台。用溶胶-凝胶固定化的方案，使这些生物活性材料称为，更好地保持酶活性的特别有希望的材料，提高蛋白质的化学稳定性和热稳定性。对于生物传感中这些材料的广泛用途来说，一些重要的考虑因素，包括靶分析物大小的限制、连续生物传感并合并成设备。用当前的合成方法，对生物大分子（如蛋白质）固定在基体中的孔中，但小分析物则通过多孔网络扩散。纳米结构材料未来的应用是，允许生物大分子扩散，也允许其他生物大分子保持在最理想的孔中。基于溶胶-凝胶的生物传感器连续感测的可行性尚未完全搞清楚，因为大多数研究已经针对论证概念的证据。今后的工作就是连续

监测，同时结合溶胶-凝胶传感元素融入到实际的设备，并使这些材料在生物传感技术中产生广泛影响。

致谢

我们非常感谢 Dorothy Nguyen 博士、Jenna Rickus 博士、Jing C. Zhou、James R. Lim、Maria H. Chuang 和 Pauline Chang 在综述中所做的贡献。我们也衷心感谢美国全国卫生基金会（DMR 0103952 和 DMR 0099862 项目）和美国航空航天局（NAG9-1252 项目）对本研究的支持。本工作也得到了细胞模拟太空探索中心的部分支持和美国航空航天局大学研究、工程和技术研究所通过奖项 NCC 2-1364 给我们的支持。

参考文献

[1] Hench, L. L. and West, J. K. (1990) The sol-gel process. *Chem. Rev.* 90, 33–72.

[2] Brinker, C. J., Keefer, K. D., Schaeffer, D. W., and Ashley, C. S. (1982) Sol-gel transition in simple silicates. *J. Non-Cryst. Solids* 48, 47–64.

[3] Brinker, C. J. and Scherer, G. W. (1985) Sol-gel glass: gelation and gel structure. J. Non-Cryst. Solids 70, 301–322.

[4] Brinker, C. J. and Scherer, G. W. (1990) *The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic, San Diego.

[5] Sakka, S. (1982) Gel method for making glass, in *Treatise on Materials Science and Technology*, vol. 22, (Herman, H. and Tomozawa, M., eds.), Academic, New York, pp. 129–167.

[6] Rickus, J. L., Dunn, B., and Zink, J. I. (2002) Optically based sol-gel biosensor materials, in *Optical Biosensors: Present and Future* (Ligler, F. S. and Rowe- Taitt, C. A., eds.), Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, pp. 427–456.

[7] Braun, S., Rappoport, S., Zusman, R., Avnir, D., and Ottolenghi, M. (1990) Bio- chemically active sol-gel glasses—the trapping of enzymes. *Mater. Lett.* 10, 1–5.

[8] Ellerby, L. M., Nishida, C. R., Nishida, F., Yamanaka, S. A., Dunn, B., Selverstone Valentine, J., and Zink, J. I. (1992) Encapsulation of proteins in trans- parent porous silicate-glasses prepared by the sol-gel method. *Science* 255, 1113–1115.

[9] Avnir, D., Braun, S., Lev, O., and Ottolenghi, M. (1994) Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials [review]. *Chem. Mater.* 6, 1605–1614.

[10] Livage, J., Coradin, T., and Roux, C. (2001) Encapsulation of biomolecules in silica gels [review]. J. Phys. Condensed Matter 13, R673–R691.

[11] Gill, I. (2001) Bio-doped nanocomposite polymers: sol-gel bioencapsulates [review]. *Chem. Mater.* 13, 3404–3421.

[12] Zink, J. I., Valentine, J. S., and Dunn, B. (1994) Biomolecular materials based on sol-gel encapsulated proteins. *N. J. Chem.* 18, 1109–1115.

[13] Chen, Q., Kenausis, G. L., and Heller, A. (1998) Stability of oxidases immobilized in silica gels. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 4582–4585.

[14] Heller, J. and Heller, A. (1998) Loss of activity or gain in stability of oxidases upon their immobilization in hydrated silica: significance of the electrostatic interactions of surface arginine residues at the entrances of the reaction channels. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 4586–4590.

[15] Lan, E. H., Dave, B. C., Fukuto, J. M., Dunn, B., Zink, J. I., and Valentine, J. S. (1999) Synthesis of sol-gel encapsulated heme proteins with chemical sensing properties. *J. Mater. Chem.* 9, 45–53.

[16] Lan, E. H., Dunn, B., and Zink, J. I. (2000) Sol-gel encapsulated anti-trinitrotoluene antibodies in immunoassays for TNT. *Chem. Mater.* 12, 1874–1878.

[17] Nguyen, D. T., Smit, M., Dunn, B., and Zink, J. I. (2002) Stabilization of creatine kinase encapsulated in silicate sol-gel materials and unusual temperature effects on its activity. *Chem. Mater.* 14, 4300–4306.

[18] Miller, J. M., Dunn, B., Valentine, J. S., and Zink, J. I. (1996) Synthesis conditions for encapsulating cytochrome C and catalase in SiO_2 sol-gel materials. *J. Non-Cryst. Solids* 202, 279–289.

[19] Eggers, D. K. and Valentine, J. S. (2001) Molecular confinement influences protein structure and enhances thermal protein stability. *Protein Sci.* 10, 250–261.

[20] Kawakami, K. and Yoshida, S. (1995) Sol-gel entrapment of lipase using a mixture of tetramethoxysilane and methyltrimethoxysilane as the alkoxide precursor—esterification activity in organic media. *Biotechnol. Techniques* 9, 701–704.

[21] Shtelzer, S., Rappoport, S., Avnir, D., Ottolenghi, M., and Braun, S. (1992) Properties of trypsin and of acid-phosphatase immobilized in sol-gel glass matrices. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 15, 227–235.

[22] Eggers, D. K. and Valentine, J. S. (2001) Crowding and hydration effects on protein conformation: a study with sol-gel encapsulated proteins. *J. Mol. Biol.* 314, 911–922.

[23] Schmid, F. X. (1990) Protein Structure: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, UK.

[24] Nayal, M., Hitz, B. C., and Honig, B. (1999) GRASS: a server for the graphical representation and analysis of structures. *Protein Sci.* 8, 676–679.

[25] Rickus, J.L., Chang, P.L., Tobin, A.J., Zink, J.I., and Dunn, B. (2004) Photochemical coenzyme regeneration in an enzymatically active optical material. *J. Phys. Chem. B.* 108, 9325–9332.

[26] Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M. (1993) *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, New York.

[27] Maccraith, B. D., McDonagh, C., McEvoy, A. K., Butler, T., Okeeffe, G., and Murphy, V. (1997) Optical chemical sensors based on sol-gel materials—recent advances and critical issues. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 8, 1053–1061.

[28] Maccraith, B. D., McDonagh, C. M., Okeeffe, G., McEvoy, A. K., Butler, T., and Sheridan, F. R. (1995) Sol-gel coatings for optical chemical sensors and biosensors. *Sens. Actuators B Chem.* 29, 51–57.

[29] McDonagh, C., Bowe, P., Mongey, K., and Mac Craith, B. D. (2002) Characterisation of porosity and sensor response times of sol-gel-derived thin films for oxygen sensor applications. *J. Non-Cryst. Solids* 306, 138–148.

[30] Altstein, M., Aharonson, N., Segev, G., Ben-Aziz, O., Avnir, D., Turniansky, A., and Bronshtein, A. (2000) Sol-gel-based enzymatic assays and immunoassays for residue analysis. *Italian J. Food Sci.* 12, 191–206.

[31] Bronshtein, A., Aharonson, N., Avnir, D., Turniansky, A., and Altstein, M. (1997) Sol-gel matrixes doped with atrazine antibodies—atrazine binding properties. *Chem. Mater.* 9, 2632–2639.

[32] Doody, M. A., Baker, G. A., Pandey, S., and Bright, F. V. (2000) Affinity and mobility of polyclonal anti-dansyl antibodies sequestered within sol-gel-derived biogels. *Chem. Mater.* 12, 1142–1147.

[33] Grant, S. A. and Glass, R. S. (1999) Sol-gel-based biosensor for use in stroke treatment. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 46, 1207–1211.

[34] Jiang, D. C., Tang, J., Liu, B. H., Yang, P. Y., and Kong, J. L. (2003) Ultrathin alumina sol-gel-derived films: allowing direct detection of the liver fibrosis markers by capacitance measurement. *Anal. Chem.* 75, 4578–4584.

[35] Jordan, J. D., Dunbar, R. A., and Bright, F. V. (1996) Aerosol-generated sol-gel-derived thin films as biosensing platforms. *Anal. Chim. Acta* 332, 83–91.

[36] Roux, C., Livage, J., Farhati, K., and Monjour, L. (1997) Antibody-antigen reactions in porous sol-gel matrices. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 8, 663–666.

[37] Shabat, D., Grynszpan, F., Saphier, S., Turniansky, A., Avnir, D., and Keinan, E. (1997) An efficient sol-gel reactor for antibody-catalyzed transformations. *Chem. Mater.* 9, 2258–2260.

[38] Turniansky, A., Avnir, D., Bronshtein, A., Aharonson, N., and Altstein, M. (1996) Sol-Gel entrapment of monoclonal anti-atrazine antibodies. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 7, 135–143.

[39] Vazquez-Lira, J. C., Camacho-Frias, E., Pena-Alvarez, A., and Vera-Avila, L. E. (2003) Preparation and characterization of a sol-gel immunosorbent doped with 2, 4-D antibodies. *Chem. Mater.* 15, 154–161.

[40] Wang, R., Narang, U., Prasad, P. N., and Bright, F. V. (1993) Affinity of antifluorescein antibodies encapsulated within a transparent sol-gel glass. *Anal. Chem.* 65, 2671–2675.

[41] Zhou, J.C., Chuang, M.H., Lan, E.H., Dunn, B., Smith, S.M., and Gillman, P.L. (2004) Immunoassays for cortisol using antibody-doped sol-gel silica. *J. Mater. Chem.* 14, 2311–2316.

[42] Ashkar, F. S. (1983) *Radiobioassay*, CRC Press, Boca Raton, FL.

[43] Pesce, A. J. and Kaplan, L. A. (1987) *Methods in Clinical Chemistry*, C.V.Mosby, St. Louis, MO.

第 4 章　组织再生药物递送系统的纳米材料

Yasuhiko Tabata

概　　述

最近已开始了一种新的治疗试验，旨在帮助人体缺乏自我修复的组织再生。其目的是，通过细胞的优势来替代受损成分和损伤器官的生物学功能。成功的组织再生不仅需要高增殖和分化潜能的细胞，而且还需要能创建适合于诱导再生的环境。这样的产品，只要通过提供各种生物材料，如细胞支架和生长因子就可以人为地实现促进细胞增殖和分化。促进组织再生通常需要生长因子，因为它们可以诱导血管生成，为器官组分需要的细胞转移，提供足够的氧和营养物，有效保持生物学功能。然而，它们在体内稳定性差的原因是，生长因子的生物效应不能长期保留，除非设计药物递送系统（DDS）。为了提高生物材料和药物递送系统技术在再生医学中的意义，本章综述了组织再生的几种研究方法。

关键词：组织工程；组织再生；再生医学；生物材料；药物递送系统；生长因子释放

4.1　导　　论

4.1.1　组织再生的必要技术

当身体组织或器官严重受伤、大量的缺损或发生了障碍，临床上通常使用外科手术重建或器官移植进行治疗。毫无疑问，虽然这些程序都挽救了无数患者的生命，但这些疗法目前面临一些临床挑战。替代和解决这个难题的方法，就是让患者通过他们的自愈潜能，诱导自己的身体组织和器官再生。生物医学领域带来了一种新的治疗理念就是组织工程。组织工程是生物医学技术之一，旨在协助基础研究在临床中的应用，即患者的“再生”医药和“再生”医学治疗，包括天然组织的再生，以及为有缺陷或失去组织和器官在细胞水平上创造生物零件[1]。

毫无疑问，为了成功地实现组织再生，不仅需要增加构成组织细胞的数量，而且还要重建结构，以支持细胞的所谓细胞外模型（ECM）的增殖和分化。此外，常常需要促进组织再生的生长因子，取决于组织的类型。总之，所需的组织工程的组件包括细胞、为细胞增殖和分化提供的支架及生长因子。

最近，人们已经清楚地认识到，对细胞外模型不仅需要生理支撑细胞，还需要细胞

增殖和分化（或形态）两者都起重要作用，从而使组织再生和器官形成。仅仅给缺陷组织提供细胞，而使大的缺陷组织自然再生和修复是不可能的。尽管如此，有少数病例，简单将健康细胞加入到适当部位，也成功实现组织再生。例如，一种实用的方法是，在缺陷部位通过首先建立一个支架，作为人工暂时促进细胞附着和随后的细胞增殖及分化，以提供适合人工 ECM 诱导组织再生的环境。人们强烈期望，如果人工 ECM 与细胞适合，自我繁衍细胞会定居在支架周围，或在支架中预置的细胞会在提供的支架基础上增殖和分化。一旦启动了新的组织再生过程，构成组织的细胞最终产生天然的和合适的 ECM。然而，在这个过程中，任何剩余的细胞支架材料生理上会妨碍组织再生。因此，对于成功的组织再生来说，应该优化和控制缺陷部位的支架降解时间。由于修复组织有朝向再生的高活性，通过周围健康组织渗入未成熟细胞和激活，生物降解支架基质中就形成新组织。然而，如果组织的再生潜力非常低，例如，由于细胞的渗透差和新组织生成需要的生长因子浓度低，那么就需要增加补充的方法。抵消这些条件最简单的方法，就是在再生的部位为细胞分化和增殖提供生长因子。

然而，直接将溶液形式的生长因子注射到再生部位常是无效的，因为注入的生长因子被迅速扩散，并从该部位分泌出去。一种有希望提高体内生长因子效率的途径，是使用药物递送系统（DDS）。例如，将生长因子包裹在适当的载体中，在作用部位控制生长因子的释放，延长活化时间。它能够保护生长因子防止蛋白质水解，只要它在载体内，就能够延长保留在体内的活性。生长因子释放后，载体应该在体内被降解，因为不再需要它了。因此，重要的是利用生物可降解支架和 DDS 技术创造适合诱导组织再生环境，对于组织再生或器官替代具有普遍意义。即使基础生物学和医学对细胞研究取得了很大进展，患者的“再生”医学治疗也将永远不会被单独研究成果所实现，除非提供适当的再生环境。

4.1.2　组织工程综述

按执行组织工程的条件可将组织工程分为两类：体外组织工程和体内组织工程（图 4.1）。体外组织工程涉及组织重建和器官替代，否则称为生物人工器官。表 4.1 提供组织和经历组织工程的器官。基于结合细胞、支架和生长因子已对靶组织和器官进行了广泛研究[1]。

如果在工厂或实验室能进行大规模组织重建，患者需要时就可以提供组织构建体。可行性一旦建立，这种方法对商业化将有非常大的吸引力。然而，使用目前可用的细胞培养技术来完成体外重建，这是相当困难的。另一种体外组织工程方法是，器官功能通过同种异体或异种细胞来替代。这样的工程器官被称为生物人工器官，因为它们是由异质性细胞和人造膜或多孔结构组成，用于免疫隔离以保护细胞免受宿主的攻击并维持细胞功能。这一方法已应用于肝脏、胰脏和肾脏的再生[2,3]。

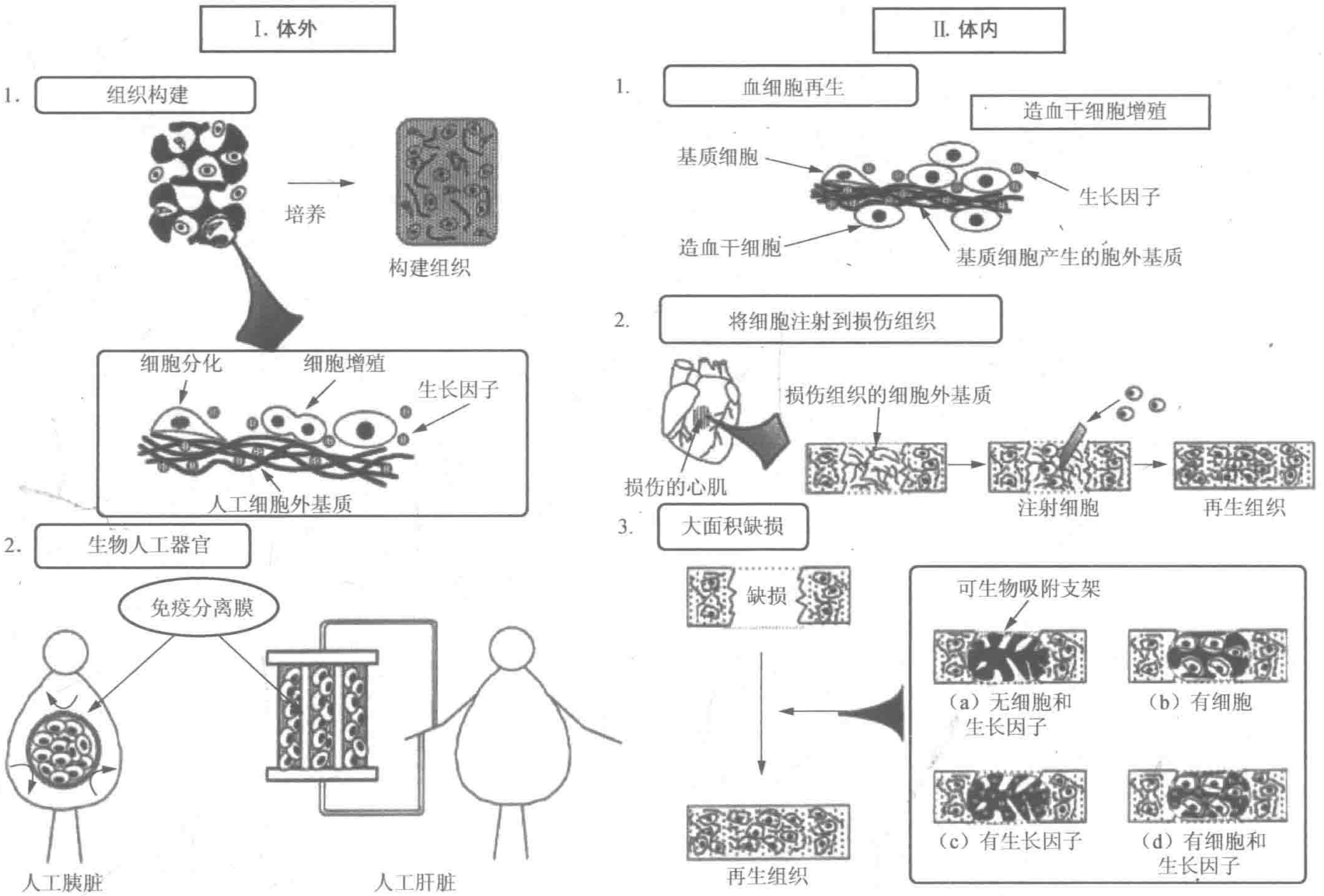


图 4.1　组织工程基本原理

表 4.1　再生和组织工程构建的组织和器官

构建部位	细胞	组织再生 支架	支架＋生长因子	栅栏膜	器官成分 栅栏膜
体外	必需	皮肤（真皮和表皮）、关节软骨、骨、动脉、心肌	—	—	肝脏、胰脏、肾脏
体内	不需要	真皮、硬脑膜、食道、气管	骨（头骨、下巴、长骨）、毛发、小动脉、平滑肌、膀胱、牙周组织	外周神经、牙周组织、牙槽骨	—
体内	需要	皮肤、眼角膜、视网膜、动脉、软骨（纤维和透明软骨）、骨（颅骨、颌骨、长骨）、心肌、气管、食管、小肠、胃、平滑肌、膀胱、输尿管、中枢神经	乳房、脂肪、毛发、心肌、肝脏、肾脏	外周神经	肝脏、胰脏、嗜铬细胞（血管）

与体外组织工程截然不同的是，体内组织工程具有的优点，是使用天然环境诱导组织再生。大多数组织再生需要的材料是由宿主活体主动提供。因此，几乎所有的组织工程，目前均已经在具有或不具有生物降解能力支架的体内实现。如果效果好的话，这种方法是比较现实和临床上可以接受的。如果健康的 ECM 在体内仍然适应，就没有必要用人工支架了。除了骨髓移植外，眼睛相关的干细胞正在用于有缺陷的角膜、视网膜的再生[4]，心肌细胞的移植已经试验性地用于心肌梗死的尝试治疗[5]。对于大缺陷器官的再生，绝对需要使用一种可生物降解的支架。植入有或无种子细胞支架。例如，最流行的材料是海绵状胶原[6]，因为胶原蛋白支架与细胞相容且在体内被降解，从而防止生理阻碍新的组织结构。在体内组织工程中，使用胶原海绵或使用无细胞接种聚合物片已成功地诱导真皮皮肤[7]、气管[8]、食道[9]和硬脑膜[10]的再生。

有许多身体组织不能再生，除非使用接种有特别需要的组织再生细胞的支架。表皮和软骨的再生就必须分别将角质形成细胞和软骨细胞种植到支架上。从血管和小肠中分离的细胞已与生物降解支架结合，在体内实现了各器官的再生[11,12]。骨髓细胞也被广泛地用于这个目的；骨髓细胞含有可以分化成骨细胞系的间质干细胞（MSC）[13,14]。有可能接种多于一种类型的细胞用于由几种亚组织组成的组织再生。例如，三种不同的结合有骨膜、软骨细胞和肌腱重建的支架分别用于指骨、小指骨的重建，以及软骨和肌腱（韧带）的重建[15]。

有时成功的组织再生，不能仅仅通过结合细胞和它们的支架来实现。这种情况下，一个实用的能促进组织生成的方法是，使用适当的生长因子。生长因子的类型不仅取决于所研究的靶组织，也取决于预期产生组织的部位。除了单独使用生长因子外，为了加速组织再生，有时还需要考虑多种生长因子与细胞骨架的结合。

当身体遭受缺陷时，缺陷空间会很快被普遍存在于体内且能迅速增殖的成纤维细胞产生的纤维组织填满。纤维结缔组织内生长一旦发生，其他组织的进一步修复或再生就被有效终止。为了防止组织向内生长，必须加入称为栅栏膜的生物材料。目的是使组织再生有空间并防止不期望的组织向内生长，从而由天然组织修复缺陷。一些成功的例子包括引导失去外周神经纤维的通道再生[16]和引导失去了牙周组织和牙槽骨的再生。应该

使用生物降解材料制备栅栏膜，因为组织再生完成后不再需要它们了。本章介绍基于用DDS生长因子与拥有细胞或无细胞支架的组织再生的几个研究试验。

4.2 材　料

人重组碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）等电点9.6（10mg/ml）的水溶液，由Kaken公司（东京，日本）慷慨提供。用碱从牛骨（I型胶原）中提取的等电点5.0（Nitta Gelatin公司，大阪，日本）的明胶样品。0.1mol/L的NaOH和*N*-琥珀酰亚胺基-3-(4-羟基-3,5-di^{125}I碘苯基)丙酸甲酯、碘化钾（Na^{125}I）水溶液购自NEN，杜邦公司（威尔明顿，特拉华州，美国）。戊二醛、甘氨酸和其他化学品购自Wako公司（大阪，日本），无需进一步纯化即可使用。

4.3 方　法

4.3.1 吸收生长因子明胶水凝胶的制备

用戊二醛与明胶水溶液交联制备明胶水凝胶。简单地说，40μl的（25%质量分数）水性戊二醛溶液与40ml预热至40℃的明胶水溶液（5%质量分数）混合后，将混合水溶液注入聚丙烯盘（18cm×18cm）中；混合物在4℃放置12h，使明胶进行交联。然后冲出产生的水凝胶片，获得明胶水凝胶圆盘（直径6mm，厚度为3mm），将圆盘放入50ml 100mmol/L甘氨酸水溶液中，随后在37℃下搅拌1h以封闭未反应的戊二醛残余醛基。交联的水凝胶圆盘用双蒸水（ddH$_2$O中）洗涤两次，然后冷冻干燥，并用环氧乙烷气体灭菌。水凝胶在磷酸盐缓冲液（pH 7.4）中37℃膨胀24h后，计算水凝胶质量，明胶凝胶（存在于水凝胶中水的质量比）的含水量为96.0%（质量分数）。

碱性成纤维细胞生长因子原溶液用双蒸水稀释，以调节溶液的浓度。将水性的bFGF溶液（20μl）滴入到冻干明胶水凝胶圆盘，使圆盘吸入bFGF。25℃保持2h，使bFGF溶液被完全吸收到水凝胶盘中，因为该溶液体积明显小于理论上水凝胶膨胀达到平衡所需要的水量。同样，加入双蒸水作为溶液，制备没有bFGF的空明胶凝胶。

4.3.2 明胶水凝胶结合生长因子的表征

根据植入^{125}I标记的明胶水凝胶的放射性的损失，评价体内明胶水凝胶的降解。检测碘标记水凝胶^{125}I放射性。简单地说，将在无水苯溶液中加入100μl ^{125}I鲍尔通-亨特试剂，通入干燥氮气鼓泡直至苯蒸发完成。然后，将1ml的0.1mol/L的硼酸钠缓冲液（pH 8.5）加入到干燥试剂中，以制备^{125}I鲍尔通-亨特试剂水溶液。该水溶液以20μl /圆盘量灌注到明胶凝胶冻干圆盘中。溶胀的凝胶在4℃保持3h以诱导剩余的^{125}I进入到明胶的氨基上。放射性碘化明胶水凝胶置于双蒸水中，将其在4℃下定期地交换4天以去除非

耦合的、游离的 ^{125}I 标记试剂。当定期测量时，漂洗 3 天后双蒸水的放射性返回到背景水平。溶胀水凝胶进行冷冻干燥。根据明胶凝胶放射性的损失评价体内植入 ^{125}I 标记明胶凝胶的降解。将各种类型的 ^{125}I 标记的明胶凝胶注入 ddY 小鼠的背部皮下组织（每组 3 只小鼠，6～7 周龄）。凝胶注入后第 1 天、第 3 天、第 5 天、第 7 天、第 10 天、第 14 天和第 21 天用伽马计数器测凝胶的放射性。接下来，将鼠背部凝胶位点周围的皮肤切成 3cm×5cm 条，用滤纸擦去边缘部分，然后测植入水凝胶剩余放射性。所测放射性总量与最初植入水凝胶放射性之比，表示水凝胶降解残存活性的百分比。

用冷冻干燥凝胶的圆盘吸收 ^{125}I 标记的 bFGF 水溶液制备掺入 ^{125}I 标记的 bFGF 明胶水凝胶。按以前报道的氯胺 T 法制备 ^{125}I 标记的 bFGF [18]。将各种类型的掺入 ^{125}I 标记的 bFGF 明胶凝胶植入到小鼠的背部。^{125}I 标记的 bFGF 水溶液皮下注射到小鼠的背部。间隔不同的时间，根据刚才描述的方法，在小鼠背部植入水凝胶的区域注射或直接注射 ^{125}I 标记的 bFGF。明胶水凝胶与皮肤条加滤纸剩余的放射性用伽马计数器测定，它们的放射性对 bFGF 最初的放射性之比表示 bFGF 在体内释放剩余活性的百分比。

最近，许多研究已经为组织再生贡献了生长因子与各种载体材料组合（表 4.2）。所有结果都断言生长因子与载体的组合诱导体内组织再生是必需的。除了蛋白质生长因子外，基因编码生长因子最近已应用到促进组织再生[19]。如果相应的基因转染到已经存在再生部位的细胞中，一定的时间段内，细胞很可能能分泌生长因子，从而促进组织再生。通过使用相应的生长因子基因对缺血性疾病[20]和骨组织再生[21]血管生成疗法进行了试验。

表 4.2　生长因子与载体组合的组织再生尝试实验

生长因子	载体	动物	组织再生
骨形态发生蛋白（BMP）	聚乳酸（PLA）	狗	长骨
	胶原蛋白海绵	大鼠	长骨
		狗、猴	牙周韧带和牙骨质
	β-多孔陶瓷药物载体（β-TCP）	兔	长骨
	气孔羟磷灰石（HA）	兔	头盖骨
人重组骨形成发生蛋白-2（rhBMP-2）	多孔聚乳酸（PLA）	狗	脊椎骨
		大鼠	头盖骨
	聚乳酸（PLA）微球体	兔	头盖骨
	胶原蛋白海绵	狗	牙周组织
	明胶	兔	头盖骨
	含聚乳酸（PLA）明胶海绵	狗、猴	长骨、颌骨、头盖骨
	多孔羟磷灰石（HA）	猴	头盖骨
	聚乳酸-聚乙二醇（PLA-PEG）共聚体	大鼠	长骨
人重组骨形态发生蛋白-7（rhBMP-7）	胶原蛋白	狗	脊椎骨
		狗	长骨
表皮生长因子(EGF)	琼脂糖	仓鼠	血管再生
	聚乙烯醇（PVA）	大鼠	真皮

续表

生长因子	载体	动物	组织再生
酸性成纤维细胞生长因子（aFGF）	聚乙烯醇（PVA）	小鼠	血管再生
	藻酸盐	小鼠	血管再生
碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）	藻酸盐	小鼠	血管再生
	琼脂糖/肝素	小鼠、猪	血管再生.
	支链淀粉	小鼠	血管再生
	明胶	小鼠	血管再生，真皮、脂肪生成
		兔、猴	头盖骨
		狗	神经
	纤蛋白凝胶	小鼠	血管再生
	胶原蛋白小球	兔	长骨
	胶原蛋白	小鼠	软骨
	聚（乙烯-共-乙酸乙烯酯）	大鼠	神经
神经生长因子（NGF）	胶原蛋白小球	兔	神经
	聚乳酸-羟基乙酸共聚物（PLGA）	大鼠	神经
转化生长因子-β1（TGF-β1）	聚乙二醇（PEG）	大鼠	真皮
	明胶	兔	头盖骨
	巴黎石膏、聚乳酸-羟基乙酸共聚物（PLGA）	大鼠	头盖骨
	磷酸钙（TCP）	狗	长骨
	多孔羟磷灰石（HA）	狗	长骨
	胶原蛋白	狒狒	头盖骨
		小鼠	真皮
重组人血小板衍生生长因子-BB（PDGF-BB）	多孔羟磷灰石（HA）	兔	长骨
	胶原蛋白	大鼠	真皮
	壳聚糖	大鼠	牙根骨
血管内皮生长因子（VEGF）	胶原蛋白	小鼠	血管再生
	藻酸盐	小鼠	血管再生
肝细胞生长因子（HGF）	明胶	小鼠	血管再生
胰岛素 1 号生长因子（IGF-1）	聚乳酸羟基乙酸共聚物-聚乙二醇（PLGA-PEG）	大鼠	脂肪形成
胰岛素 1 号生长因子/碱性成纤维细胞生长因子（IGF-1/bFGF）	聚乳酸羟基乙酸共聚物-聚乙二醇（PLGA-PEG）	大鼠	脂肪形成
血小板衍生因子/胰岛素 1 号生长因子（PDGF/IGF-1）	钛植入	狗	颌骨

4.4 注 意 事 项

4.4.1 控制生长因子释放的明胶水凝胶特征

蛋白质释放技术的最大问题之一，是从蛋白质-载体制剂释放的蛋白质降低了生物活性。已经证实，活性减小的主要原因是在载体制备时蛋白质变性和失活。因此，应使用惰性生物材料制备蛋白质释放载体，减少蛋白质变性。从这个观点出发，聚合物水凝胶由于其对蛋白质药物的生物相容性和高度惰性，是最合适的蛋白质药物释放载体候选材料。

我们已经创建了模拟活体内生长因子递送天然模型的生长因子释放系统。图 4.2 是基于生长因子和聚合物分子之间的物理化学相互作用力，控制生物可降解聚合物水凝胶中释放生长因子的概念图。例如，用带负电荷的生物降解聚合物制备水凝胶。带正电荷的生长因子被聚合物链静电吸引，因此在水凝胶的载体中是物理固定化。如果环境改变，如增加离子强度，就会重现从载体制剂中释放固定化生长因子。即使这样的环境不发生变化，载体自身的降解，也导致生长因子释放。因为在体内，后者比前者更可能发生，因此用生物降解聚合物制备释放载体是首选。这就是络合保护生长因子以免在体内变性和被酶降解。

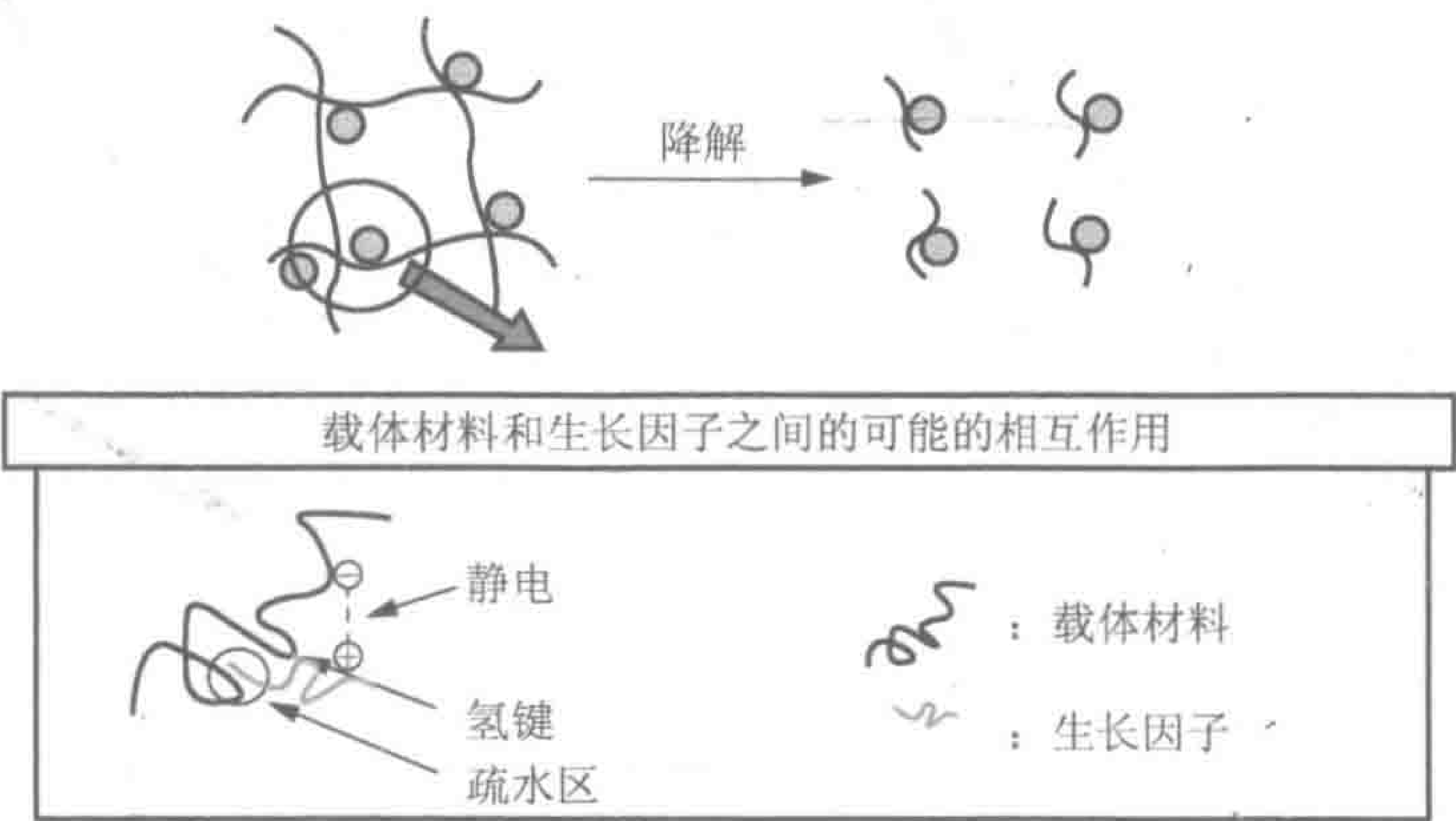


图 4.2 基于物理相互作用力的生物可降解水凝胶释放生长因子的概念图

我们选择明胶作为生长因子的释放材料，因为它具有所需的物理化学性质，并已被广泛用于工业、制药和医学。明胶的生物安全性已获得长期临床应用的证明。明胶另一独特优点是它的带电性质，带电性质可通过加工方法来改变。例如，胶原蛋白的碱性处理，导致天冬酰胺和谷氨酰胺残基的氨基水解，产生高密度的羧基，使明胶带负电荷，明胶的等电点约为 5.0。与此相反，在酸性处理时，明胶的性质非常不同。制备了“碱性”带正电荷的明胶，等电点为 9.0。如果释放的是分子中带正电荷的生长因子，与存在于外

皮生长因子的酸性多糖作用，那么带负电荷的“酸性”明胶就是合适的载体材料。考虑到静电相互作用，“碱性”明胶适合释放带负电荷分子。发现如预期的一样，碱性成纤维细胞生长因子中转化生长因子-β1（TGF-β1）或血小板衍生生长因子被吸附到酸性明胶水凝胶中主要是由于静电作用[22]。

动物试验表明，从酸性明胶制备的水凝胶可在体内降解[23]。水凝胶的降解时间取决于含水量，用于衡量交联程度：水凝胶含水量越高，在体内的降解越快。水凝胶的含水量随用于制备水凝胶的化学交联剂浓度和明胶浓度的增加而增加。体内 bFGF 保留的时间与水凝胶降解相关，与水凝胶的生物降解能力无关。这似乎是合理的假设，就像水凝胶降解一样，在体内随着明胶片段降解而从明胶水凝胶中释放 bFGF。这些结果强烈表明，如图 4.2 所描述的一样，生长因子释放主要由水凝胶降解所控制。在该释放系统中，释放时间不会被水凝胶形状所干扰，但受到水凝胶降解速率的变化所控制。注意，明胶水凝胶可以形成为圆盘、管状、片状、颗粒状和微球等不同的形状[24,25]。

4.4.2　明胶水凝胶结合成纤维细胞生长因子的组织再生

如 4.4.1 节所述，发现明胶水凝胶是控制生长因子释放的优质载体。今后介绍，通过单独使用本释放系统或与干细胞组合，完成对血管生成、骨再生和脂肪形成的具体试验结果。

4.4.3　血管的再生术

已报道碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）有多种生物学功能[26]，能有效地通过诱导血管生成和骨、软骨及神经组织再生，促进伤口愈合。在进行生物学作用时，明胶水凝胶有效提高了 bFGF 体内血管生成效果。当结合了 bFGF 明胶水凝胶被植入到小鼠的背部皮下组织时，在植入部位周围观察到血管生成作用，与植入游离的 bFGF，空的明胶水凝胶或注射 bFGF 水溶液的部位形成鲜明的对照[22]。注射 bFGF 溶液，甚至增加到 1mg/部位仍然没有诱导血管生成。该结果肯定是注射部位的 bFGF 被快速消除了[27]。与此相反，组合了 bFGF 的明胶水凝胶能诱导，即使低至 30μg/部位也能显著诱导血管生成。水凝胶诱导血管生成作用的维持期可以通过延长水凝胶的含水量如含水量变低来改变[27]。很可能是具有较低含水量的水凝胶降解更缓慢，从而在体内释放生物活性 bFGF 迅速低于那些高含水量的水凝胶，导致血管生成延长。采用结合 bFGF 微球型明胶凝胶时，同样观察到提高和延长血管生成的作用[24]。

人工诱导体内血管生成是组织工程必不可少的技术。诱导血管生成的两个目标，包括局部缺血性疾病的治疗和先进的血管生成细胞移植。作为前者的例子，这里介绍局部缺血心肌的结合 bFGF 明胶凝胶治疗。通过结扎左前降支（LAD）诱导狗心脏冠状动脉心肌梗死。将结合 bFGF 的明胶微球在心肌内注射到结扎左前支 10mm 末端两侧。对照组注射相同剂量 bFGF 水溶液。注射含有 bFGF 明胶微球体，诱导结扎左前降支部位的侧支冠状动脉再生和增加左冠状动脉回旋支（LCX）血流量（图 4.3）。更有趣的是，注射微球对缺血区域心肌运动的恢复有效。注射相同剂量 bFGF 溶液没有观察到这些治疗

效果[1]。

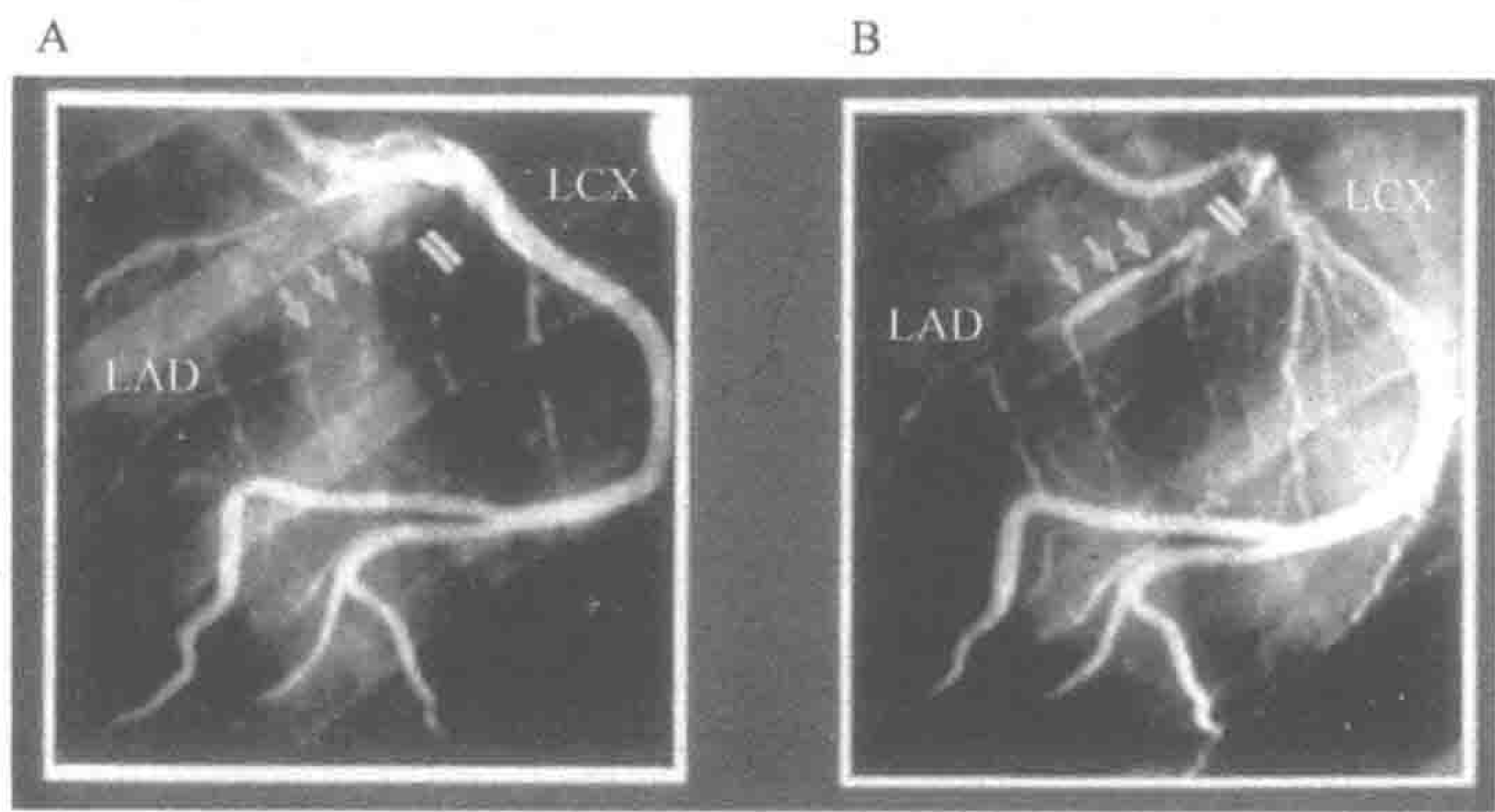


图 4.3 心肌内注射（A）bFGF 溶液和（B）植入 bFGF 明胶微球后 1 周狗心脏缺血性左冠状动脉造影。在左前降支结扎部分（由标示 II 表示）末端两侧注射 bFGF 100μg/心脏剂量。水凝胶的含水量为 95.0%（质量分数）

毫无疑问，供给体内移植细胞足够营养和氧气，对于维持细胞的存活和生物功能是必不可少的。如果没有充足的营养供给，植入组织再生支架上的细胞在支架植入体内后将很难生存。这样的情形是由同种异体或异种细胞移植到体内替代器官造成的。对于成功的细胞移植，相对于免疫隔离来说，营养和氧供应是主要挑战。如果两者都供给，通过血管生长因子细胞位点移植，有希望诱导血管的生成。在最近的研究中，胰岛由水凝胶袋包埋而有效免疫隔离和植入到链脲佐菌素诱导的糖尿病性小鼠的 SC 组织中。含有能激活装入胶囊的胰岛而提高存活率的 bFGF 明胶微球，诱导移植细胞部位优势血管生成，从而延长葡萄糖在血液中维持正常水平的保持期（图 4.4）[28]。这一发现证明，含有 bFGF 明胶微球可以在皮下甚至是糖尿病小鼠中都可以诱导体内血管生成，相对于健康小鼠来说，它只有较小的损伤修复能力。最重要的是能诱导即使有病的患者或老年人

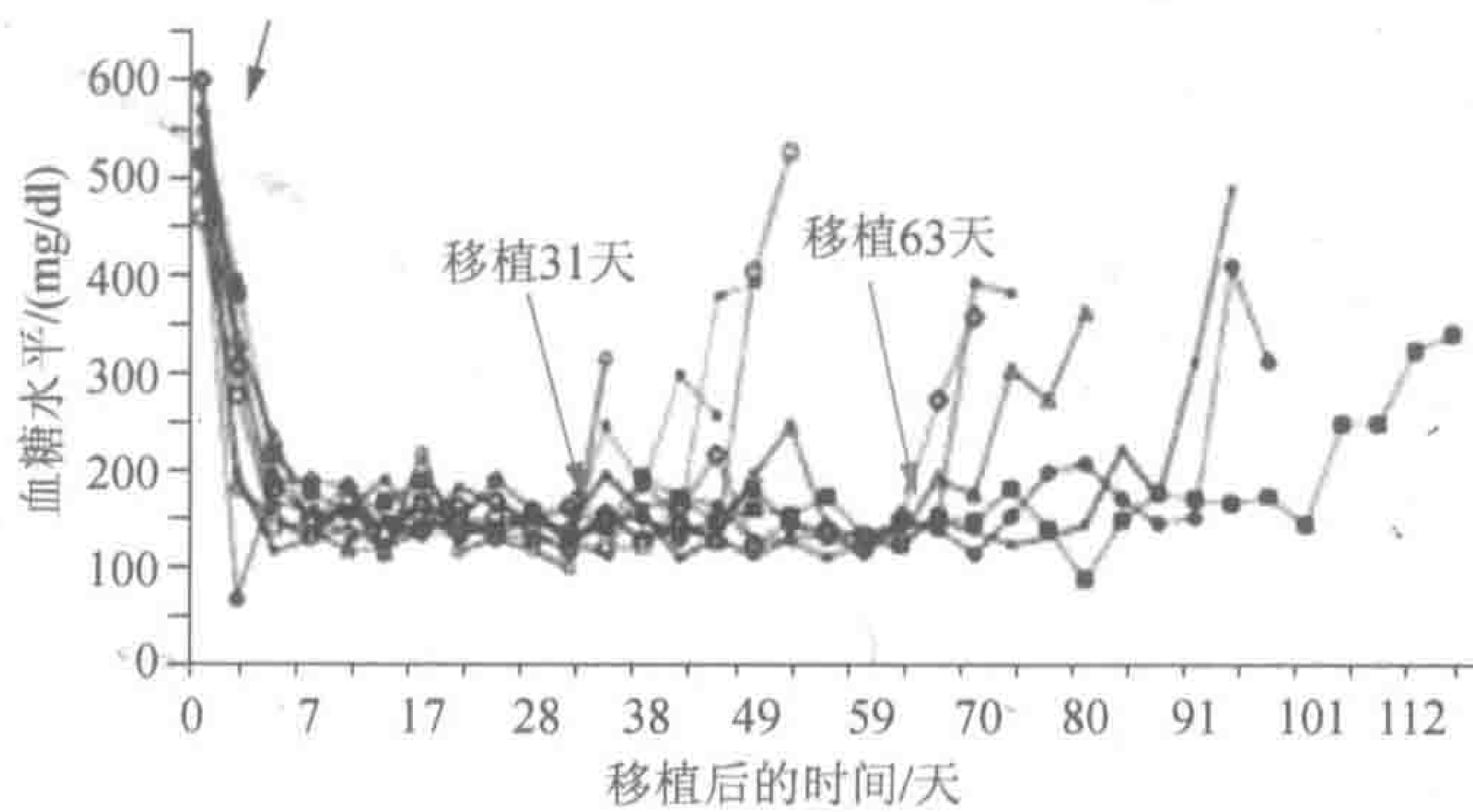


图 4.4 提前注射含 bFGF 的明胶微球（小箭头，移植）诱导琼脂糖/聚苯乙烯磺酸水凝膜进入血管的大鼠胰岛 SC 异种移植后糖尿病鼠血液中血糖水平时间曲线。在分别移植 31 天（○、*和□）和 63 天（◇、×、△、+、◆和■）（大箭头）时，有 2/10 会再次成为高血糖。这有力地表明，装入胶囊的小岛在糖尿病小鼠的皮下能正常起作用。平均血糖正常时间为（68.4±25.6）天

的身体组织再生。很少组织工程研究完成老年动物试验。这个领域的研究在考虑组织工程临床应用时，无疑将成为非常重要的课题。已观察到肝细胞[29]和心肌细胞[30]的移植，这种血管生成作用能延长细胞存活。

4.4.4 骨的再生

发现结合 bFGF 的明胶水凝胶是骨修复一种有前途有潜力的技术[31,32]。例如，当植入到猴颅骨缺损部位 21 星期后，吸附 bFGF 的明胶凝胶促进缺损部位骨的再生，缺损再合拢。与此相反，利用无 bFGF 的明胶凝胶和使用在溶液中类似剂量的 bFGF，结果不出现骨的再生，并且在骨缺损部分的软结缔组织生长异常。颅骨缺损的骨密度（BMD）测定结果表明，不考虑水凝胶的含水量，含有 bFGF 的明胶凝胶比没有 bFGF 显著提高了骨密度。植入无 bFGF 的明胶与未处理组的骨密度水凝胶物所得结果相似，表明水凝胶的存在并没有影响缺陷骨愈合。在组织学研究中，水凝胶植入增加了骨缺损边缘附近骨质胚细胞定居的数量，并在研究的时间范围内保持在一个显著高的水平。

众所周知，转录生长因子 TGF-β1 和骨形态发生蛋白（BMP）也促进骨再生[33~36]。通过控制明胶凝胶中 TGF-β1 的释放，我们已经成功地对兔子和猴子骨骼和颅骨缺损进行了修复[34]，与无 TGF-β1 或高剂量 TGF-β1 形成了鲜明对照。然而，修复程度取决于水凝胶含水量的减少或增加。这可能是水凝胶降解过快引起短时间内 bFGF 释放，导致没有诱导骨的再生。相反，由于水凝胶降解缓慢而长期残留也妨碍骨的再生。其结果，水凝胶可能有一个诱导颅骨缺损处骨再生的最佳生物降解性[34]。如前所述，携带生长因子水凝胶的功能与防止内生成纤维组织进入骨缺损区域的载体一样。两种水凝胶时间进程的平衡将导致骨骼更好的修复。最近，我们用不同明胶类型成功地控制 BMP-2 的释放。这种控释系统，在溶液中无 BMP-2 更低剂量时，能使 BMP-2 诱导异位或原位骨组织形成。

还有一些情况，生长因子和干细胞的受控释放的组合能有效地实现骨修复。在一项试验中，我们使用原位潜力细胞并组合生长因子释放系统。骨髓间质干细胞（MSC）是从兔腓骨的骨髓中分离的细胞。我们已证实 MSC 与含有 TGF-β明胶微球组合可以形成新骨组织而完全修复兔颅骨，与只用一种材料形成鲜明对比[37]。所以，单独使用 TGF-β释放系统的情况下，因为剂量太低而无效。

4.4.5 脂肪形成

将吸收 bFGF 的明胶微球与基底膜提取物（基质胶）混合后，皮下植入小鼠的背部，在植入部位观察新形成的脂肪组织[38]。最近，从脂肪组织中前成脂肪细胞与吸附 bFGF 明胶微球和胶原蛋白海绵组合，我们成功诱导了新脂肪形成（图 4.5）。将前成脂肪细胞和微球体放入胶原蛋白海绵中，植入到小鼠的背部皮下组织，从植入的海绵位点可观察到新形成的脂肪组织。这个方法需要三种材料组合才能诱导脂肪形成[39]。这些实验结果证明体内组织工程策略可以通过在身体部位建立一个合适的环境而实现组织再生。

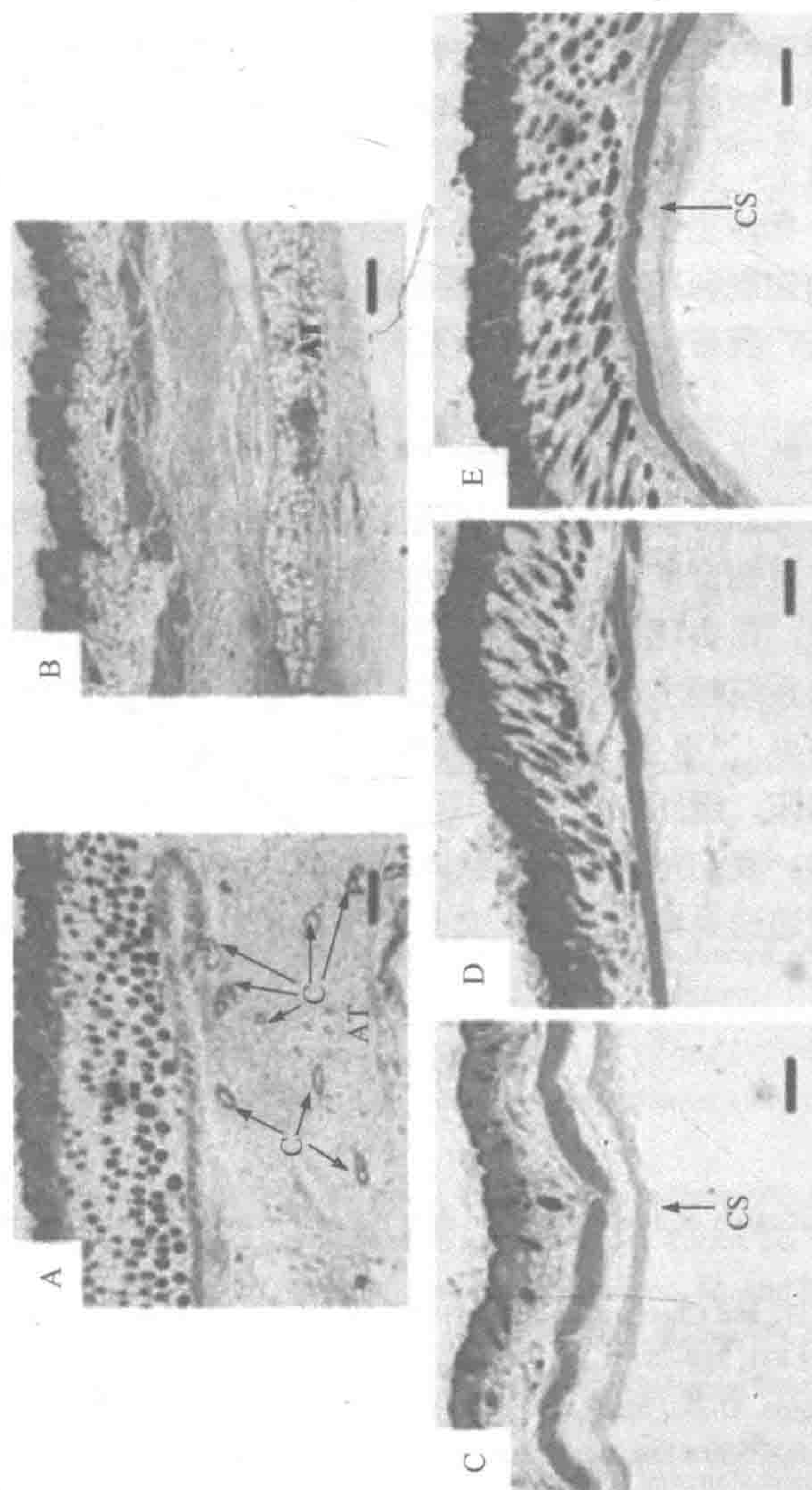


图4.5　从头形成的胶原海绵含有前脂肪细胞和明胶微球结合的bFGF的混合物在植入后6周的脂肪组织在小鼠皮下组织的：（A）胶原海绵含有前脂肪细胞和gela-锡微球结合的bFGF的混合物；（B）胶原蛋白海绵含脂肪前体细胞和免费的bFGF的混合物；（C）胶原蛋白海绵含脂肪前体细胞；（D）前脂肪细胞和明胶微球结合的bFGF的混合物；（E）胶原蛋白海绵载有荷兰国际集团结合的bFGF明胶微球。（放大倍数：×100；苏丹III染色）。结合bFGF的明胶微球完全降解，从注射部位消失。所述的bFGF剂量为10μg/位点和水凝胶的水含量为95.0%（质量分数）。比例尺=300μm。

CS. 胶原蛋白海绵；AT. 新成立的脂肪组织；C.新成立的毛细血管（彩图请扫封底二维码）

4.4.6　结论

为了实现组织的再生，体内各种生长因子作用细胞，是通过复杂的网络对作用时间、作用部位和生长因子浓度进行微妙的调节而实现。细胞生物学、分子生物学和胚胎学的迅速发展，将有可能阐明生命系统中的组织再生机制。即使如此，仅仅利用目前的科学

知识和技术模拟生命系统是不可能的事情。但是，生命机制的阐明将有助于研究人员了解诱导靶组织再生时，哪些生长因子是关键因子。如果在需要的部位提供合适时间、合适浓度的关键生长因子，我们相信将激发生命体走向自然组织再生过程。一旦朝着组织再生正确方向前进，身体完整系统将开始做功，组织再生自动完成。毫无疑问，只要使用生长因子，它们的控制释放将是未来重要的技术。最近，bFGF 在日本市场已经用于治疗皮肤溃疡和褥疮。我希望这将是切入点，鼓励基于生长因子药物递送系统技术在组织再生的临床应用。

如果组织工程成熟了，这将是重建手术和器官移植治疗医学的第三个选择，它会给患者带来许多治疗选择和特权。为此，还需要材料、医药、生物学、医学科学和临床医学的研究人员进行实质性合作努力，才能达到组织工程学术和技术走向成熟。由于组织工程仍处于起步阶段，在实现发挥其潜力之前，还要花费大量的时间进行研究。如果无细胞支架和药物递送系统技术诱导组织再生，就干细胞来说，药学、生物学和分子生物学的任何研究进展结果，“再生”医药的最终目的——患者的医学治疗永远不可能实现。为了再生医药实用临床，组织工程是必不可少的工具。药物递送系统的研究瞄准组织再生及器官替代的方向。我们坚信，大多数本章的读者，在未来组织工程发展中能更好地理解生物材料及药物递送系统。希望本文会提高读者对这一研究领域的兴趣。

参 考 文 献

[1] Tabata, Y. (2001) Significance of biomaterials and drug delivery systems in tissue engineering. *Connect. Tissue* 33, 315–324.

[2] Prokop, A., Hunkeler, D., and Cherrington, A. D. (1997) Bioartificial organs, sciences, medicine, and technologies. *Ann. NY Acad. Sci. USA* 831, 249–298.

[3] Humes, H. D., Buffington, D. A., MacKay, S, M., Funke, A. J., and Weitzel, W. F. (1999) Replacement of renal function in uremic animals with a tissue-engineered kidney. *Nat. Biotechnol.* 17, 451–455.

[4] Tsubota, K., Satake, Y., Kaido, M., Shinozaki, M., Shimmura, S., Bissen-Miyajima, H., and Shimazaki, J. (1999) Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 340, 1697–1703.

[5] Li, R. K., Jia, Z.-Q., Weisel, R. D., Mickle, D. A., Zhang, J., Mohabeer, M. K., Rao, V., and Ivanov, J. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. (1996) *Ann. Thorac. Surg.* 62, 654–660.

[6] Shimizu, Y. (1998) Tissue engineering for soft tissue, in *The Tissue Engineering for Therapeutic Use 2* (Ikada, Y. and Enomoto, S., eds.), Elsevier Science B.V. Publisher, Amsterdam, The Netherlands, pp. 119–122.

[7] Yannas, I. V. and Burke, J. F. (1980) Design of an artificial skin. 1. Basic design principle. *J. Biomed. Mater. Res.* 14, 65–81.

[8] Okumura, N., Nakamura, T., Shimizu, Y., Tomihata, K., Ikada, Y., and Shimizu, Y. (1994) Experimental study on a new tracheal prosthesis made from collagen-conjugated mesh. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 108, 337–341.

[9] Takimoto, Y., Nakamura, T., Yamamoto, Y., Kiyotani, T., Teramachi, M., and Shimizu, Y. (1998) The experimental replacement of a central esophageal segment with an artificial prosthesis with the use of collagen matrix and a silicone stent. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 116, 98–106.

[10] Yamada, K., Miyamoto, S., Nagata, I., Kikuchi, H., Ikada, Y., Iwata, H., and Yamamoto, K. (1997) Development of a dural substitute from synthetic bioabsorbable polymers. *J. Neurosurg.* 86, 1012–1017.

[11] Shinoka, T., Shum-Tim, D., Ma, P. X., Tanel, R. E., Isogai, N., Langer, R., Vacanti, J. P., and Mayer, J. E. Jr. (1998)

Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 115, 536–546.

[12] Kaihara, S., Kim, S. S., Kim, B. S., Mooney, D., Tanaka, K., and Vacanti, J. P. (2000) Long-term follow-up of tissue-engineered intestine after anastomosis to native small bowel. *Transplantation* 69, 1927–1932.

[13] Ohgushi, H. and Caplan, A. I. (1999) Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* 48, 913–927.

[14] Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C. Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147.

[15] Isogai, N., Landis, W., Kim, T. H., Gerstenfeld, L. C., Upton, J., and Vacanti, J. P. (1999) Formation of phalanges and small joints by tissue-engineering. *J. Bone Joint Surg.* 81, 306–316.

[16] Valentini, R. F. (1995) Nerve guidance channels, in *The Biomedical Engineering Handbook* (Brozine, J. D., ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1985–1996.

[17] Ishikawa, I. and Arakawa, S. (1998) Awareness of periodontal disease—the role of industry. *Intern. Dent. J.* 48, 261–267.

[18] Parker, C. W. (1990) Radiolabelling of proteins. *Methods Enzymol.* 182, 721–737. 19.

[19] Bonadio, J., Goldstein, S. A., and Lecy, R. J. (1998) Gene therapy for tissue repairing and regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 33, 53–69.

[20] Lee, J. S. and Feldman, A. M. (1998) Gene therapy for therapeutic myocardial andiogenesis: a promising synthesis of two emerging technologies. *Nat. Med.* 4, 739–742.21.

[21] Bonadio, J., Smiley, E., Patil, P., and Goldstein, S. (1999) Localized, directed plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue engineering. *Nat. Med.* 5, 753–759.

[22] Tabata, Y. and Ikada, Y. (1998) Protein release from gelatin matrices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 31, 287–301.23.

[23] Tabata, Y., Nagano, A., and Ikada, Y. (1999) Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Eng.* 5, 127–138.

[24] Tabata, Y., Hijikata, S., Munirzzaman, M. D., and Ikada, Y. (1999) Neo-vascularization through biodegradable gelatin microspheres incorporating basicfibroblast growth factor. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 10, 79–94.

[25] Tabata, Y., Morimoto, K., Katsumata, H., Yabuta, T., Iwanaga, K., Kakemi, M., and Ikada, Y. (1999) Surfactant-free preparation of biodegradable hydrogel microspheres for protein release. *J. Bioactive Compatible Polym.* 14, 371–384.

[26] Rifkin, D. B. and Moscatelli, D. (1989) Structural characterization and biological functions of basic fibroblast growth factor. *J. Cell Biol.* 109, 1–6.

[27] Tabata, Y. and Ikada, Y. (1999) Vascularization effect of basic fibroblast growth factor released from gelatin hydrogels with different biodegradabilities. *Biomaterials* 20, 2169–2175.

[28] Wang, W., Gu, Y., Tabata, Y., Miyamoto, M., Hori, H., Nagata, N., Touma, M., Balamurugan, A. N., Kawakami, Y., Nozawa, M., and Inoue, K. (2002) Reversal of diabetes in mice by xenotransplantation of a bioartificial pancreas in a prevascularized subcutaneous site. *Transplantation* 73, 122–129.

[29] Ogawa, K., Asonuma, K., Inamoto, Y., Tabata, Y., and Tanaka, K. (2001) The efficacy of prevascularization by basic FGF for hepatocyte transplantation using polymer devices in rats. *Cell Transplant.* 83, 281–302.

[30] Sakakibara, Y., Nishimura, K., Tambara, K., Yamamoto, M., Lu, F., Tabata, Y., and Komeda, M. (2002) Prevascularization with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor enhances the benefits of cardiomyocyte transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 124, 50–56.

[31] Tabata, Y., Yamada, K., Miyamoto, S., Nagata, I., Kikuchi, H., Aoyama, I., Tamura, M., and Ikada, Y. (1998) Bone regeneration by basic fibroblast growth factor complexed with biodegradable hydrogel. *Biomaterials* 19, 807–815.

[32] Tabata, Y., Yamada, K., Hong, L., Miyamoto, S., Hashimoto, N., and Ikada, Y. (1999) Skull bone regeneration in primates in response to basic fibroblast growth factor. *J. Neurosurg.* 91, 851–856.

[33] Hong, L., Tabata, Y., Yamamoto, M., Miyamoto, S., Yamada, K., Hashimoto, N., and Ikada, Y. (1998) Comparison of bone regeneration in a rabbit skull defect by recombinant human BMP-2 incorporated in biodegradable hydrogel and in solu- tion. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 9, 1001–1014.

[34] Hong,L.,Tabata,Y.,Miyamoto,S.,Yamamoto,M.,Yamada,K.,Hashimoto,N., and Ikada, Y. (2000) Bone regeneration at rabbit skull defects treated with trans- forming growth factor-β1 incorporated into hydrogels with different levels of bio- degradability. *J. Neurosurgery* 92, 315–325.

[35] Yamamoto, M., Tabata, Y., Hong, L., Miyamoto, S., Hashimoto, N., and Ikada, Y. (2000) Bone regeneration by transforming growth factor β1 released from a biodegradable hydrogel. *J. Control. Release* 64, 133–142.

[36] Hong, L., Tabata, Y., Miyamoto, S., Yamada, K., Aoyama, I., Tamura, M., Hashimoto, N., and Ikada, Y. (2000) Promoted bone healing at rabbit skull gap between autologous bone fragment and the surrounding intact bone with biodegrad- able microspheres containing transforming growth factor β1. *Tissue Eng.* 6, 331–340.

[37] Tabata, Y., Hong, L., Miyamoto, S., Miyao, M., Hashimoto, N., and Ikada, Y. (2000) Bone formation at a rabbit skull defect by autologous bone marrow combined with gelatin microspheres containing TGF-β1. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 11, 891–901.

[38] T abata, Y., Miyao, M., Inamoto, T., Ishii, T., Hirano, Y., Y amaoki, Y., and Ikada, Y. (2000) De novo formation of adipose tissue by controlled release of basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng.* 6, 279–289.

[39] Kimura, Y., Ozeki, M., Inamoto, T., and Tabata, Y. (2003) Adipose tissue engineering based on human preadipocytes combined with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* 24, 2513–2521.

第5章　S层蛋白纳米技术

Bernhard Schuster, Erica Györvary, Dietmar Pum, Uwe B. Sleytr

概　述

生物学、化学、材料学和固体物理学的学科交叉为纳米科学开辟了种类繁多的创新机会。其中一个主要的挑战是自组装系统技术的利用，即分子在平衡条件下自发地缔合产生超分子聚集体。这种过程的吸引力在于建立统一，超小功能单位的能力；为生命科学和非生命科学开拓介观和宏观尺度结构的可能性。细菌细胞表面蛋白（S 层蛋白）结晶的应用，为超分子结构和几十纳米维度设备的组装提供了新方法。已经证明，S 层蛋白特别适合生产，包括所有类别生物分子的分子构建试剂盒。生物分子在固体衬底上的有序固定化和在一定区域进行纳米维度的控制，是许多应用，包括开发生物分析传感器、生物芯片、分子电子学、生物相容表面和功能膜、细胞和整体循环中信号处理的关键需求。

关键词：表层；S 层；二维蛋白质晶体；仿生学；自组装；纳米技术；纳米生物技术；纳米粒子；构建试剂盒；载体脂膜

5.1　导　论

许多原核生物细胞外表面具有规则排列的（糖）蛋白（参见参考文献[1]）。这些表层单分子结晶，被称为 S 层[2]。它们存在于有细胞壁细菌和蓝细菌的几乎每一个分类群成员中，是古细菌细胞膜普遍的特征（图 5.1）。S 层通常由单一的蛋白质或糖蛋白组成，具有分子质量 40 000～230 000Da 的糖蛋白类，并表现出在 3～30nm 范围内斜角形（p1、p2）、正方形（p4）或六边形（p3、p6）的对称性晶格（图 5.2）。一个形态单元分别由 1 个、2 个、3 个、4 个或 6 个相同的亚基组成。单分子阵列一般为 5～10nm 厚，气孔大小（直径 1.5～8nm）和形态相同。大多数 S 层，外表面比内表面更少皱褶。此外，S 层是与内外表面的净电荷和疏水性有关的向异性结构[3,4]。由于对 S 层结晶性质、功能基团（如羧基、氨基、羟基）重复组成蛋白质晶格的周期性。

S 层具有高度匀称结构和亚基，是所有细菌细胞蛋白中最丰富的成分，因此这些晶体阵列，是体内外超分子结构的动态研究方面的最佳模型。此外，S 层蛋白的使用，为超分子结构和设备组装提供了新方法。已经证明 S 层蛋白特别适合，作为构建生物分子试剂盒的构件和模式元件，包括所有主要类别的生物和化学合成分子或纳米粒子。在这方面，分离的 S 层（糖）蛋白亚基最重要的特性之一，就是它们能在悬浮液、空气界面、固体表面、流动的脂质单层（图 5.3）、脂质体或粒子中重新组装成单分子阵列（见参考

文献[5]~[8])。

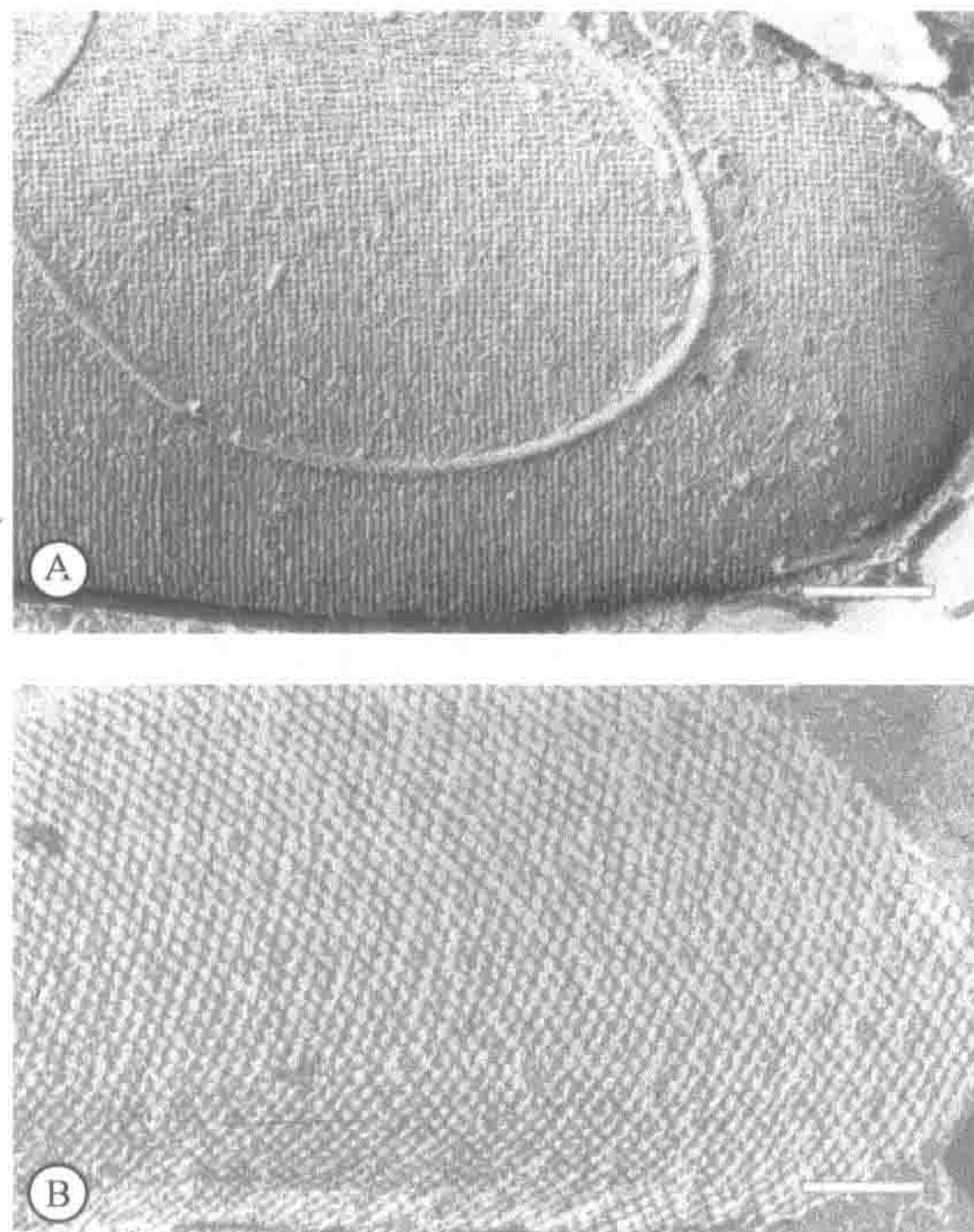


图 5.1　全细胞制备的冷冻蚀刻的电子显微照片。(A) 球形芽孢杆菌 (*B.sphaericus*)，呈现正方形 S 层晶格 (B) 热硫化氢热原 (*Thermoplasma thermohydrosulfuricus*)，呈现六方形有序阵列棒：(A) 比例尺=200nm；(B) 比例尺=100nm (转载自参考文献[45]并征得出版商的许可；©2001，Elsevier Science)

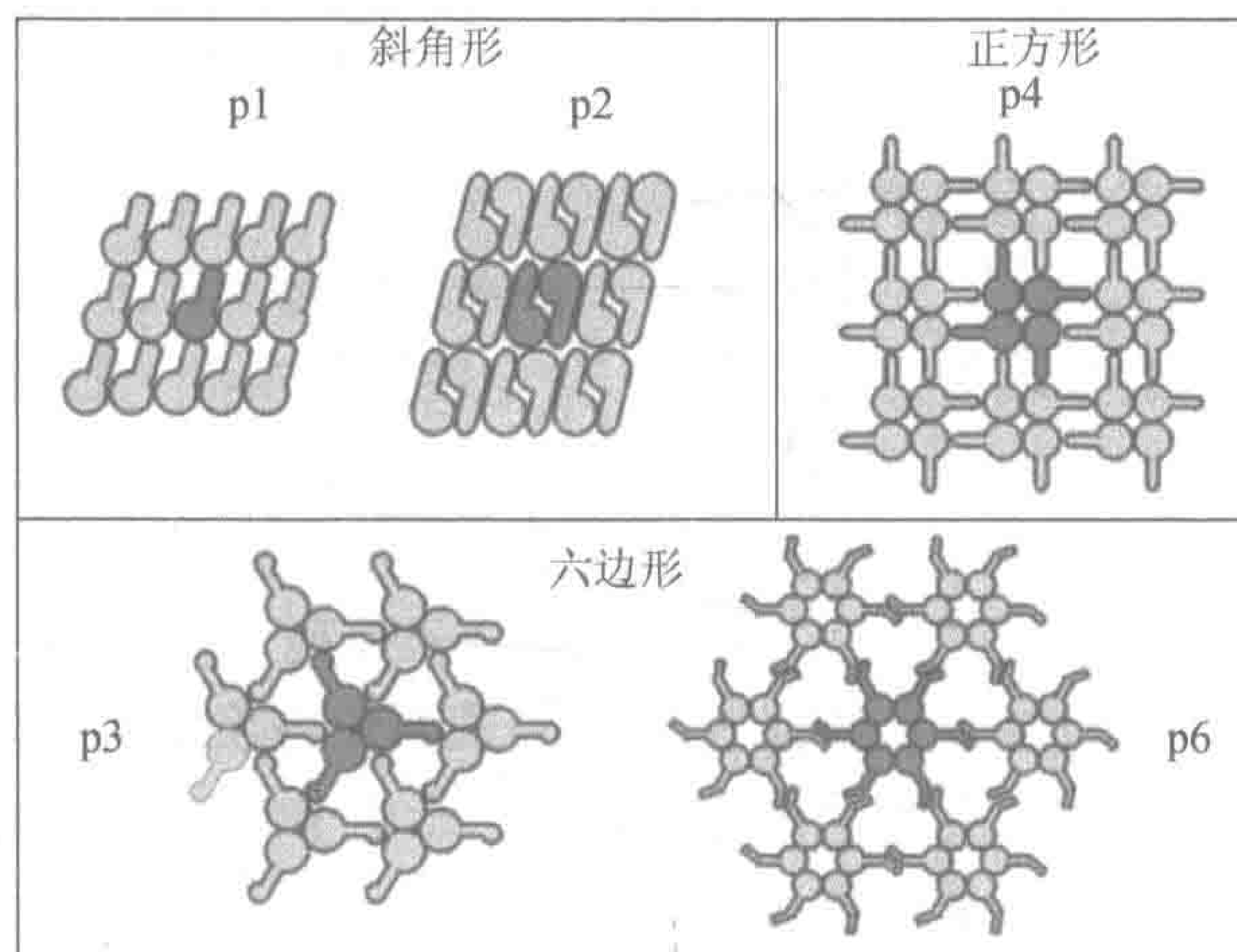


图 5.2　根据可能的基团群对称性组成的 S 层晶格类型示意图。任意地选择的形态单位以深灰色表示(转载自参考文献[8]并征得出版商的许可；©2003，Wiley-VCH)

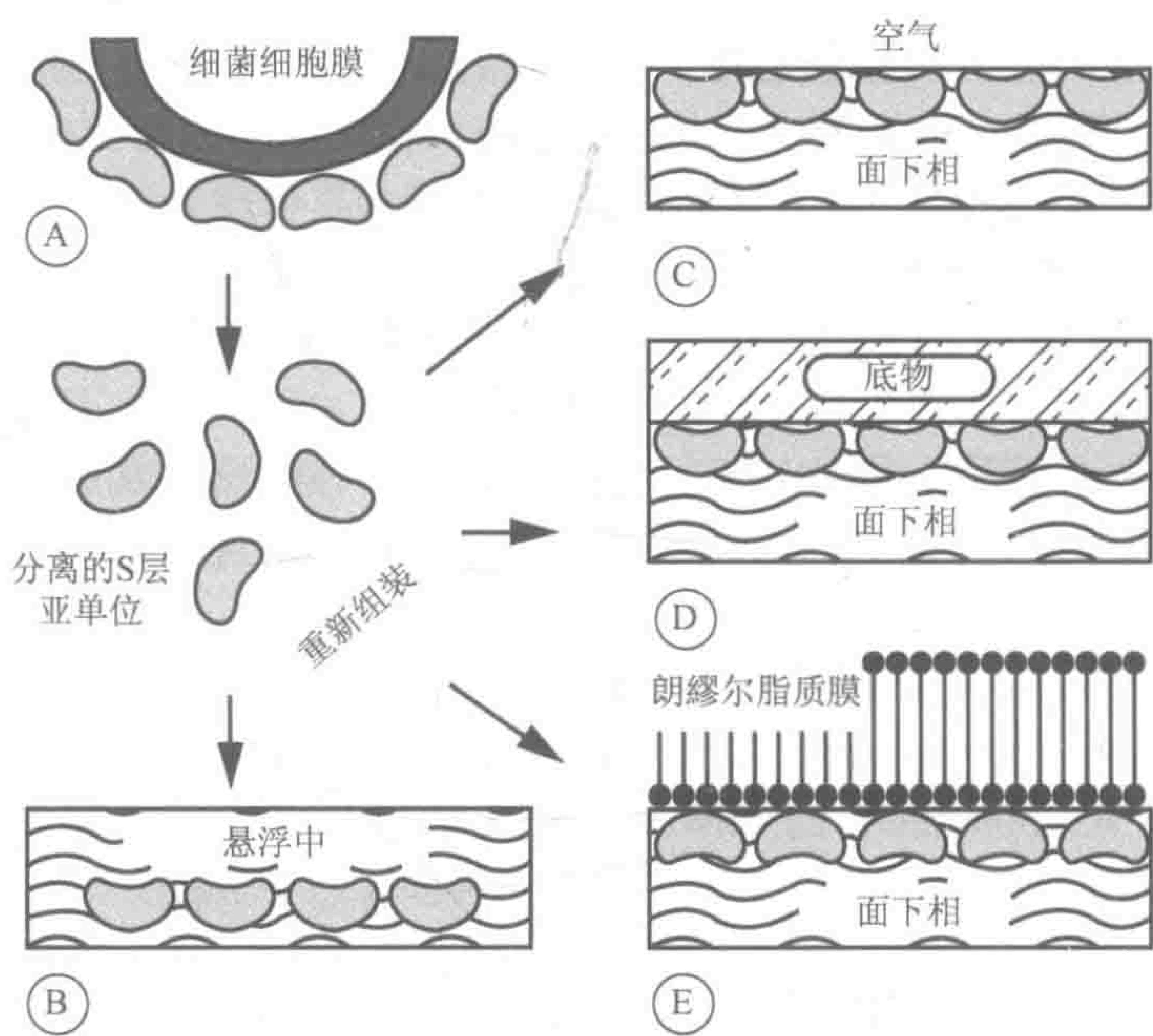


图 5.3 （A）隔离 S 层亚基成晶体阵列的重结晶示意图。自组装过程可以发生（B）悬浮液中，（C）在空气-液体界面，（D）在固体载体和（E）朗缪尔脂质膜上（转载自参考文献[5]并征得出版商的许可；©1999，Wiley-VCH）

目前开发 S 层技术的一条重要路线，是针对 S 层蛋白的遗传操纵。这些战略为具体调整其结构和功能开创了新的可能性。同时，S 层蛋白结合保持自组织能力的其他蛋白质特定功能域的结合，将会产生新的超滤膜、亲和机构、酶膜、金属沉淀衬底、微载体、生物传感器、诊断学、生物相容性表面和疫苗等[6,7]。

虽然到目前为止，大部分 S 层技术开发都关注生命科学，但未来重要新兴领域应用涉及非生命科学。在固体载体上天然的或转基因的 S 层重结晶，可用于纳米尺度金属粒子的精确空间定位模式元件，和分子电子学及非线性光学需要的金属化学定位的衬底。

5.2 材 料

5.2.1 菌株、连续培养和分离

5.2.1.1 细菌菌株

1）嗜热脂肪芽孢杆菌 PV72（*Geobacillus stearothermophilus*）由 F. Hollaus 慷慨提供（Österreichisches Zuckerforschungsinstitut，图尔恩，奥地利）。

2）球形芽孢杆菌 CCM2177（*Bacillus sphaericus*）（Czech Collection of Microorganisms, 布尔诺，捷克共和国）。

5.2.1.2 连续培养

1）SVIII 培养基：10g/L 蛋白胨，5g/L 酵母提取物，5g/L 的实验室肉汤，1.2g/L $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$，0.1g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，0.6g/L 蔗糖。

2）Biostate E 型生物反应器（博朗公司，梅尔松根，德国）。

3）质量流量控制器（Brooks 公司，费嫩达尔，荷兰）。

4）1mol/L NaOH 和 2mol/L H_2SO_4（Merck 公司，达姆施塔特，德国）。

5）pH 和氧化还原胶探头和安培探头（Ingold 公司，乌尔多夫，瑞士）。

6）分光光度计（型号：model 25；Beckmann 公司，富勒顿，加利福尼亚州，美国）。

7）十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）仪（Bio-Rad 公司，赫拉克勒斯，加利福尼亚州，美国）。

8）密度仪（型号：Elscript 400AT/SM；Hirschmann 公司，诺伊里德，德国）。

9）离心机（型号：Sepatech 17RS；Heraeus 公司，哈瑙，德国）。

10）缓冲液 A：50mmol/L 的 Tris-HCl（Fluka 公司，布克斯，瑞士）缓冲液，调节 pH 至 7.2。

5.2.1.3 细胞壁碎片的制备

1）超声波发生器处理（型号：Ultrasonics Sonicator W-385；法明代尔，纽约州，美国）。

2）离心机（型号：JA-HS；Beckmann 公司）。

3）0.75%的 Triton X-100（Serva 公司，海德堡，德国）溶解于缓冲液 A。

5.2.1.4 S 层蛋白分离

1）5mol/L 的盐酸胍（Fluka 公司）的缓冲液 A。

2）超速离心机（型号：Beckmann L5-65）。

3）10mmol/L 的氯化钙在蒸馏水中（Fluka 公司）。

4）截流值 12～16kDa 和 25Å 的孔径透析管（Biomol 公司，汉堡，德国）。

5）分光光度计（型号：Hitachi U2000；东京，日本）。

5.2.2 S 层蛋白固相载体

5.2.2.1 固相载体

1）硅氮化物和硅晶片（100 取向，p 型，掺杂硼，灵敏性 25～45Ωcm，原生氧化层）（MEMC 公司，诺瓦拉，意大利；或 Wacker Chemitronic 公司，布格豪森，德国）。

2）金属晶片：涂覆金的载体（Pharmacia 公司，Peapack，新泽西州，美国）、钛、铝制、钯。

3）聚合物：聚酯、聚丙烯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚碳酸酯（Wettlinger Kunststoffe 公司，维也纳，奥地利）。

4）玻璃片（型号：Assistant Micro Slides No.2400；Elka 公司，桑德海姆，德国）、纤维素、云母、高取向热解石墨。

5.2.2.2 清洗和改良固相载体

1）溶剂[丙酮、丙-2-醇、乙醇、氨（29%）、过氧化氢（30%）、氯化氢（37%）、干燥甲苯（Merck 公司）]，迷你-Q 水（Millipore 公司，贝德福德，马萨诸塞州，美国）和氮气（Linde 公司，维也纳，奥地利）。

2）硅烷：十八烷基三氯硅烷、(3-甲基丙烯酰)-三甲氧基硅烷、三甲氧基硅烷、正癸二甲基氧硅烷、六甲基二硅烷、2-氨基丙基三甲氧基硅烷、3-巯基丙基（ABCR 公司，卡尔斯鲁厄，德国）。

3）等离子净化器（Gala 公司，巴特施瓦尔巴赫，德国）和氧气（Linde 公司）。

4）Kruess 接触角测量系统 G1（汉堡，德国）。

5.2.2.3 固相载体上 S 层蛋白结晶

1）缓冲液 B：1mmol/L 柠檬酸缓冲液（Fluka 公司）用 NaOH 和 HCl（Merck 公司）调节 pH 至 4.0。

2）缓冲液 C：10mmol/L 的氯化钙溶于 0.5mmol/L 的 Tris-HCl（Fluka 公司）缓冲液，用 NaOH 和 HCl（Merck 公司）调节 pH 至 9.0。

3）pH 计（型号：Mettler Toledo MP220；Schwerzenbach，瑞士）。

4）嗜热脂肪芽孢杆菌 PV72（*G. stearothermophilus*）（0.1mg/ml）（见 5.2.1.1 节）悬浮缓冲液 B。

5）球形芽孢杆菌 CCM2177（*B. sphaericus*）（0.1mg/ml）（见 5.2.1.1 节）悬浮缓冲液 C。

6）转子（型号：Reax2；Heidolph 公司，施瓦巴赫，德国）。

5.2.2.4 原子力显微镜

1）数字仪器纳米显微镜 IIIa（圣巴巴拉，加利福尼亚州，美国）或其他纳米显微镜与 E-扫描器（标称扫描尺寸：12μm）或 J-扫描仪（标称扫描尺寸：130μm）。

2）标准 200μm 长的氧化削尖氮化硅悬臂（纳米探针；数字仪表）额定弹簧常数为 0.06N/m。

5.2.3 结晶 S 层蛋白模式

5.2.3.1 S 层蛋白-覆盖固相载体

1）球形芽孢杆菌（*B. sphaericus*）CCM2177 的 S 层蛋白 SbpA（见 5.2.1.1 节）。

2）缓冲液 C（见 5.2.2.3 节）。

3）清洗和表征材料（见 5.2.2.2 节）。

5.2.3.2 光刻掩膜

用不同线-空比在线性和方形组成的石英玻璃上涂覆 100nm 厚的铬（特征尺寸为 200～1000nm）。

5.2.3.3 准分子激光

ArF 准分子激光（型号：EMG102E；Lambda Physik 公司，哥廷根，德国）。

5.2.3.4 聚二甲基硅氧烷模型

1）硅模掩膜器：4 英寸硅晶片、光刻胶（型号：Clariant AZ9260；Microchemicals 公司，乌尔姆，德国）、光刻术。

2）聚二甲基硅氧烷（PDMS）（型号：Sylgard184；Dow Corning 公司，米德兰，密歇根州，美国）。

3）烤箱（型号：Memmert U25；施瓦巴赫，德国）、干燥器。

5.2.3.5 显微镜

1）原子力显微镜（AFM）材料（见 5.2.2.4 节）。

2）荧光显微镜的材料：

a. 缓冲液 D：0.1mol/L $NaHCO_3$-Na_2CO_3 缓冲液，用 NaOH 和 HCl（Merck 公司）调 pH 至 9.2。

b. 荧光标记物[异硫氰酸荧光素（FITC）]和二甲基亚砜（DMSO）（均来自 Sigma-Aldrich 公司，维也纳，奥地利）。

c. 荧光显微镜（尼康公司，东京，日本）。

5.2.4 纳米阵列的形成

5.2.4.1 载体的制备

1）标准聚乙烯醇缩甲醛树脂（formvar）和碳涂覆的电子显微镜网格（Groepl 公司，图尔恩，奥地利）。

2）通过蒸发对网格涂层二氧化硅（型号：EPA100；Leybold-Heraeus 公司，科隆，德国）。

3）等离子氧，用于等离子体清洗器处理二氧化硅涂层网格（见 5.2.2.2 节）。

5.2.4.2 纳米粒子与 S 层蛋白的静电结合

1）在缓冲液 C 球形芽孢杆菌 CCM2177（*B. sphaericus*）（0.1mg/ml）的 S 层蛋白 SbpA 和氧处理过的二氧化硅涂覆的网格中（见 5.2.2.3 节）。

2）纳米粒子：柠檬酸盐稳定的金纳米颗粒（平均直径为 5nm；Sigma-Aldrich 公司）和氨基改性的硒化镉（硒化镉）纳米粒子（平均直径为 4nm；汉堡大学，德国）。

5.2.4.3 透射电子显微镜

1）乙酸铀（在 Milli-Q 水中的 2.5%；Merck 公司）上进行负染色。

2）透射电子显微镜（型号：TEM CM12；飞利浦公司，埃因霍温，荷兰）。

5.2.5 S 层支持的脂质膜

5.2.5.1 染色和折叠膜

1）1,2-二硬脂酸-3-磷脂酰乙醇胺（DPhyPC）（Avanti 公司，阿拉巴斯特，阿拉巴马州，美国）。

2）十六烷、正癸烷、正己烷和戊烷（Fluka 公司）。

3）氯仿和乙醇（Merck 公司）。

4）电解质：0.01～1mol/L 的 KCl 或 NaCl 的 Milli-Q 纯水和 10mmol/L 氯化钙（所有化学品来自 Merck 公司）。

5）染色膜：自制聚四氟乙烯微孔板钻孔，直径为 0.9mm，分成两个部分，每个部分容积约 12ml（更多详情请参见参考文献[9]～[11]）。

6）铜线（直径约 1mm）用特氟隆涂层（polytetra-氟）管和弯曲在 L 形成刷子。

7）折叠膜：用聚四氟乙烯膜（25μm 厚；Goodfellow 公司，剑桥，英国）自制的特氟隆微孔板，划分两个部分，每个部分体积约 3.5ml。聚四氟乙烯膜孔，直径大约 140μm，穿孔工具穿孔（内外锋利的注射器针头，细节参见参考文献[9]、[10]和[12]）。

8）两个 1ml 的一次性注射器（博朗公司，梅尔松根，德国），或其他，两个塑料管。

5.2.5.2 技术设备

1）膜片钳放大器（型号：EPC9；HEKA 公司，Lamprecht，德国），或其他，公共软件（型号：Pulse＋PulseFit8.11；HEKA 公司）。

2）两个银/氯化银（Ag/AgCl）电极（见 5.4 节注意事项 1）。

3）上面有法拉第笼的振动隔离器（Newport 公司，达姆施塔特，德国）。

5.3 方　　法

5.3.1 菌株、连续培养和分离

5.3.1.1 连续培养

嗜热脂肪芽孢杆菌 PV72（*G. stearothermophilus*）[3,13,14]在 50ml SVIII 培养基[15]中培养，57℃，300ml 摇瓶培养至对数期。在生物反应器中将 200ml 悬浮液接种到 5L SVIII 灭菌培养基中。接种前，加入 20ml 的无菌葡萄糖（共 6g 葡萄糖）溶液。57℃，300r/min 搅拌培养。连续培养稀释率保持在 $0.1h^{-1}$，通气速率为 0.5L 空气/min。加入 1mol/L NaOH 或 2mol/L 的 H_2SO_4 培养基，pH 保持在 7.2±0.2。通气速率由质量流量控制器控制。氧化还原电位由铂接触的氧化还原探针测量。用安培探头监测氧分压。用分光光度计 600nm 测定细胞密度。原则上，球形芽孢杆菌 CCM2177（*B. sphaericus*）[16]以相同的条件进行培养，但是因为这种微生物是一种嗜中温菌，应将温度降低到 32℃（见 5.4 节注意事项 2）。

为控制培养物的均一性，从生物反应器中不同时间取样 10ml。取样涂于 SVIII 琼脂培养板，57℃培养 18h 的细胞用于 SDS-PAGE [13]。凝胶系统含 4%浓缩胶和 10%分离胶。

在 SVIII 琼脂板上生长的单细胞在 SDS-PAGE 进行最终测定。用光密度测定 SDS 凝胶中两种类型 S 层蛋白相对量。

细胞的收获，用 2～4℃的干热灭菌瓶从连续培养溢出口收集培养悬浮液。从培养基中经 16 000*g*，4℃连续离心分离细胞，缓冲液 A 洗涤细胞，细胞储于−20℃备用。

5.3.1.2　细胞壁碎片的制备

将冷冻的细胞（100g）悬浮于 350ml 缓冲液 A，悬浮液分成 3 份，并用最大输出量超声波处理 2min 破碎细胞。为了避免自催化，所有的制备步骤必须在冰浴 4℃进行。接着，用 28 000*g* 离心 10min 分离完整和破碎的细胞。收集离心管上部的轻沉淀，下部黑色沉淀再悬浮于缓冲液 A 中，超声处理并沉降。这个过程重复 4 次。以除去污染质膜碎片，粗细胞壁制剂（收集粒料）萃取，采用 250ml 0.75%的 Triton X-100（溶于缓冲液 A）中，并在室温[（22±2）℃]下搅拌 10min。为了除去含有的质膜碎片，用 40 000*g* 离心 10min，重复 3 次。最后，将沉淀物于−20℃冷藏。

5.3.1.3　S 层蛋白分离

将 2mg 细胞壁碎片悬浮于含盐酸胍 30ml 的缓冲液 A 中，在室温下搅拌 30min。接下来将悬浮液以 30 000r/min，4℃超速离心 45min。（嗜热脂肪芽孢杆菌 *G. stearothermophilus* PV72）上清对蒸馏水或（球形芽孢杆菌 *B. sphaericus* CCM2177）对氯化钙溶液 4℃透析 3 次，每次至少 2h（见 5.4 节注意事项 3）。最后，该 S 层自组装的产品（见 5.4 节注意事项 4）以 40 000*g*，4℃离心 15min。含单亚基和低聚物前体上清液储存于 4℃并在 5 天内使用。用 280nm 光吸收分别测定嗜热脂肪芽孢杆菌 PV72 S 层蛋白 SbsB 和球形芽孢杆菌 CCM2177 的 S 层蛋白 SbpA，测得数据分别乘以 1.75 和 1.64。蛋白质溶液浓度调至 1mg 蛋白质/ml，并用于后述的所有重结晶实验（图 5.3）。

5.3.2　固相载体上的 S 层蛋白

5.3.2.1　固相载体的制备

将硅晶片浸渍于热丙酮，随后在丙-2-醇中漂洗，最后用乙醇和 Milli-Q 水洗涤。干净的硅表面进一步接触水的角度为 65°。为了增加基质的亲水性，硅晶片用等离子体 O_2（20s 学习时间，0.01bar① 等离子体压力，70%的功率密度，高纯度级 O_2）进行处理。将具有接触水角度 5°的等离子体处理的硅基底立即用于重结晶研究。其他固相载体（如金属、聚合物、玻璃）使用前只用乙醇和 Milli-Q 水冲洗。

为了获得更好疏水表面的硅或玻璃基板使用不同硅烷（溶液或气相）进行硅烷化程序[17,18]。将基板在 1∶1∶5 的氨水（29%）∶过氧化氢（30%）∶Milli-Q 水中，80℃清洗 10min。随后，将硅或玻璃基板用 1∶1∶6 的浓氯化氢（37%）∶过氧化氢（30%）∶去离子水，80℃下处理 15min。最后，基片用 Milli-Q 水彻底漂洗，在氮气流中干燥。这个过程称为 RCA 标准清洗法。

硅烷化后，将基板进一步用丙酮冲洗并用甲苯进行干燥。随后，将载体放入含 1%

---

① $1bar=10^5Pa=1dN/mm^2$

硅烷的无水甲苯中。硅烷化（如用癸基-二甲基硅烷）反应在室温下温和振荡 30min～2h。最后，将硅烷化载体用甲苯、甲醇和 Milli-Q 水进行漂洗。

用短链（如六甲基二硅烷）气态进行硅烷化。将载体放入有一些硅烷液滴的气密玻璃容器中 60℃烘烤 2h，最后用甲醇洗涤。

5.3.2.2　在固相载体上进行 S 层蛋白再结晶

将嗜热脂肪芽孢杆菌 PV72 的 S 层蛋白 SbsB 和球形芽孢杆菌 CCM2177 的 S 层蛋白 SbpA，分别用缓冲液 B 和缓冲液 C 重结晶。所有实验中的蛋白质浓度均为 0.1mg/ml。在事先填充有蛋白质的溶液的旋转 Eppendorf 离心管中，或在玻璃井中进行固体载体重结晶。在后一种情况下，基片被放置在空气-液体界面。室温下 4h 再结晶后，将载体用镊子取出，洗涤，并存储在 Milli-Q 处理的纯水中（4℃）。

5.3.2.3　原子力显微镜

在填充有 100mmol/L NaCl 溶液的液体微孔中接触模式扫描（图 5.4）。扫描过程中，探头所施加的力保持最小，以预防样品表面被探头改变，扫描速度约为 6Hz。用显微镜的软件逐行记录图像。

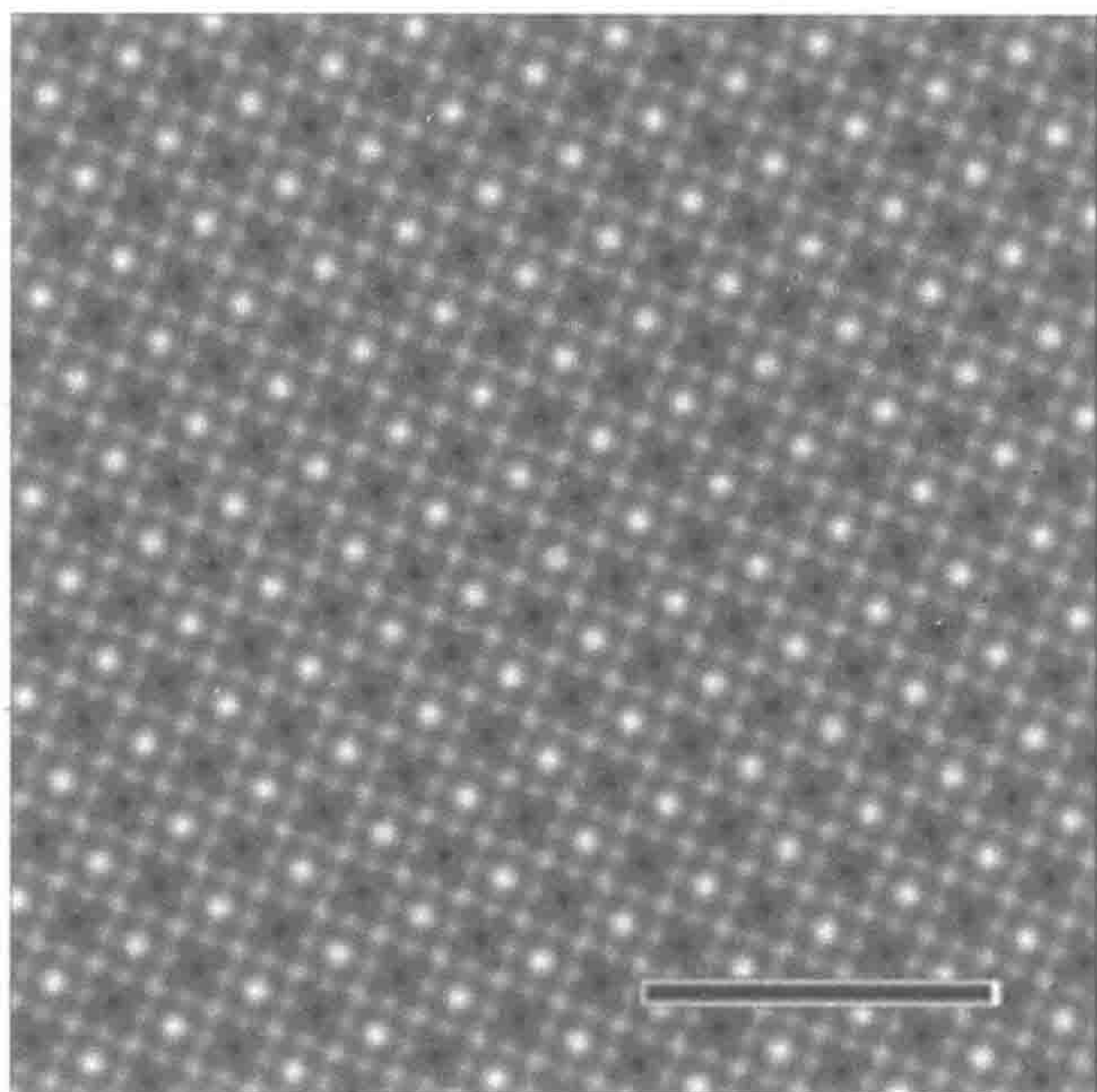


图 5.4　来自球形芽孢杆菌 CCM2177 S 层蛋白 SbpA 的重结晶的硅晶片上扫描力显微镜图像。图像记录在接触模式中的液体池（图中比例尺=50nm）（转载自参考文献[8]并征得出版商的许可；©2003，Wiley-VCH）（彩图请扫封底二维码）

原子力显微镜研究显示，在各种固体载体结晶时平均直径：SbsB 结晶域为 10～20μm，SbpA 结晶域为 0.1～10μm（表 5.1）。特别是，SbsB 只在疏水固相载体上产生单层结晶，而 SbpA 在亲水性表面形成扩展结晶区域，但在疏水性表面只有很少这样的结晶区域。

表 5.1　用于结晶 S 层蛋白的形成载体及其修饰 [a]

载体	表面和修饰	SbsB	SbpA
硅晶片（100 取向，p 形）	硅（天然氧化层）氧等离子处理	–	–
	硅（天然氧化层）	+	+[b]
	硅（天然氧化层）氧等离子处理	–	–
	Si_3N_4	+	+
	十八烷基三氯硅烷	+	+
	3-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基甲硅烷	+	+
	三甲氧基甲硅烷	+	+
	二甲基绿硅烷	+	+
	2-氨基丙基三甲氧基硅烷	+	+
	3-巯基丙基三甲氧基硅烷	+	+
金属载体	金	+	+
	钛	+	+
	铝	n	+
	钯	+	+
高分子材料	聚酯纤维	+	n
	聚丙烯	+	+
	聚(乙烯对苯二酸酯)	n	+
	聚(甲基丙烯酸甲酯)	n	+
	聚碳酸酯	+	n
其他	玻璃	+	+
	纤维素	+	+
	云母	–	+
	高定向热解石墨	–	+

a. +结晶化；–非结晶化，n 没有试验；b. 非常大的结晶域

5.3.3　S 层蛋白结晶模式

5.3.3.1　准分子激光模式

用溶剂和 O_2 等离子体清洗硅晶片（见 5.3.2 节）。如先前所述，将分离的 S 层蛋白在硅芯片晶片上再结晶（见 5.3.2 节）。

在照射前，将重结晶的 S 层蛋白小心地以高纯度氮气流干燥，以除去保持蛋白质晶格完整结构性不需要的过量水（见 5.4 节注意事项 5）。然后，将光刻掩模与 S 层涂覆的硅晶片直接接触（图 5.5）。整个组件用每脉冲约 100mJ/cm^2 的（脉冲持续时间：8ns；1 个脉冲/s）的强度 ArF 准分子激光照射 1～5 个脉冲系列（见 5.4 节注意事项 6）。最后，去除掩模和 S 层涂覆的硅晶片，立即浸渍在缓冲液中。

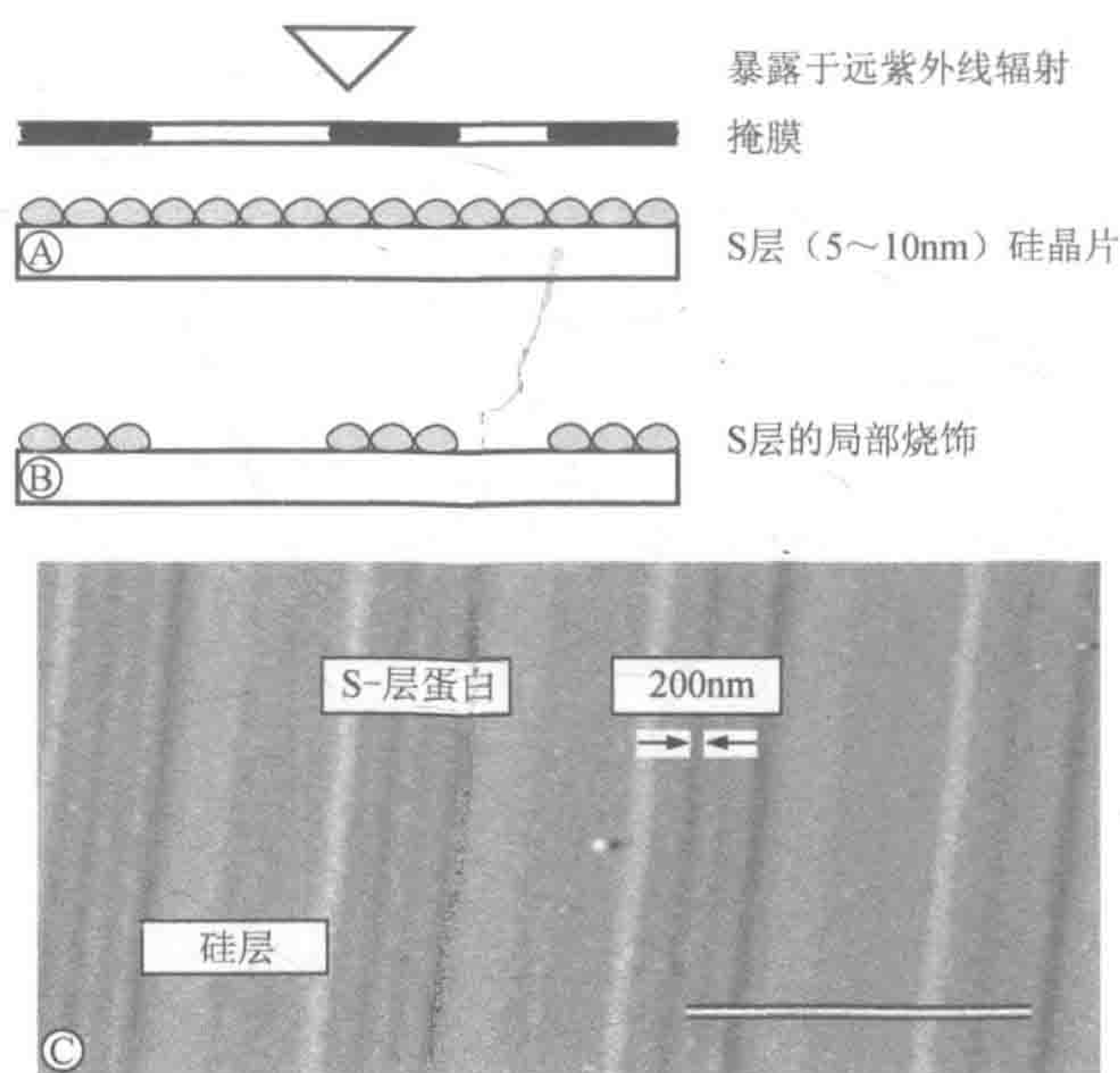


图5.5 为S层图案化以暴露于远紫外线（DUV）辐射示意图。(A) 中的图案是通过微光刻掩模转印到S层通过暴露于ArF准分子激光辐射。(B) 中的S层在规格美云从硅表面在曝光区域除去。示出现在硅晶片上的图案化的S层。(C) 是一种扫描力显微镜图像。比例尺=3μm（改自参考文献[5]并征得出版商的许可；©1999，Wiley-VCH）

通过ArF准分子激光辐射已经图案化的S层蛋白也可用作为在纳米/显微光刻法高分辨率蚀刻掩模。本应用中，需要通过在无电镀的金属化之前到活性离子蚀刻之后增强模式蛋白层。由于S层仅5～10nm厚，因而比传统的光刻胶（500～1000nm的平均厚度）小得多，邻近效应大大降低，边缘分辨率得到了相当大的改善。为了开发生物分析传感器，S层模式也用于特异性靶位区域结合生物活性分子的电极结构。

5.3.3.2 软光刻模式

众所周知，在毛细微模塑（MIMIC）[19,20]的软光刻技术，可用于在硅载体上形成涂层和形成自组装的二维S层蛋白阵列。为了形成模型，将6μm高的台面结构（mesa-structure）模型掩膜与4英寸硅晶片光刻胶结合。用聚二甲基硅氧烷（PDMS）产生掩膜模型[21,22]。将部分PDMS和一部分弹性体混合，在干燥器中脱气。将PDMS溶液放入放置在培养皿中的掩膜上再次脱气，至无气泡为止。将PDMS模具在50℃烘烤至少4h，随后从掩膜取出并切成适当大小。当再次嵌入到PDMS凹槽时，微通道形成，然后与典型的天然氧化末端硅晶片平面载体接触。

随后通过毛细管作用，将蛋白质溶液（缓冲液C中SbpA 0.1mg/ml）填充到微通道一端。模型使用前用O_2等离子体处理（溶剂清洗）硅载体，以便增加表面湿润性和改善通道的填充（见5.4节注意事项7）。S层蛋白自组装和结晶（30min～24h）后，在Milli-Q水中除去PDMS模具，在载体上留下S层阵列涂层。用原子力显微镜或落射荧光显微镜

检测涂层（见 5.3.2 节）。

为了显微检测荧光，用异硫氰酸荧光素（FITC）标记蛋白质结构（见 5.4 节注意事项 8）。S 层蛋白模式固相载体与异硫氰酸荧光素悬浮液（100μl 二甲基亚砜中含 1mg 的异硫氰酸荧光素，用 2ml 缓冲液 D 稀释）在室温下黑暗中保温 1h。标记后，样品用缓冲液 D 洗涤，最后用落射荧光显微镜研究涂层（图 5.6）。

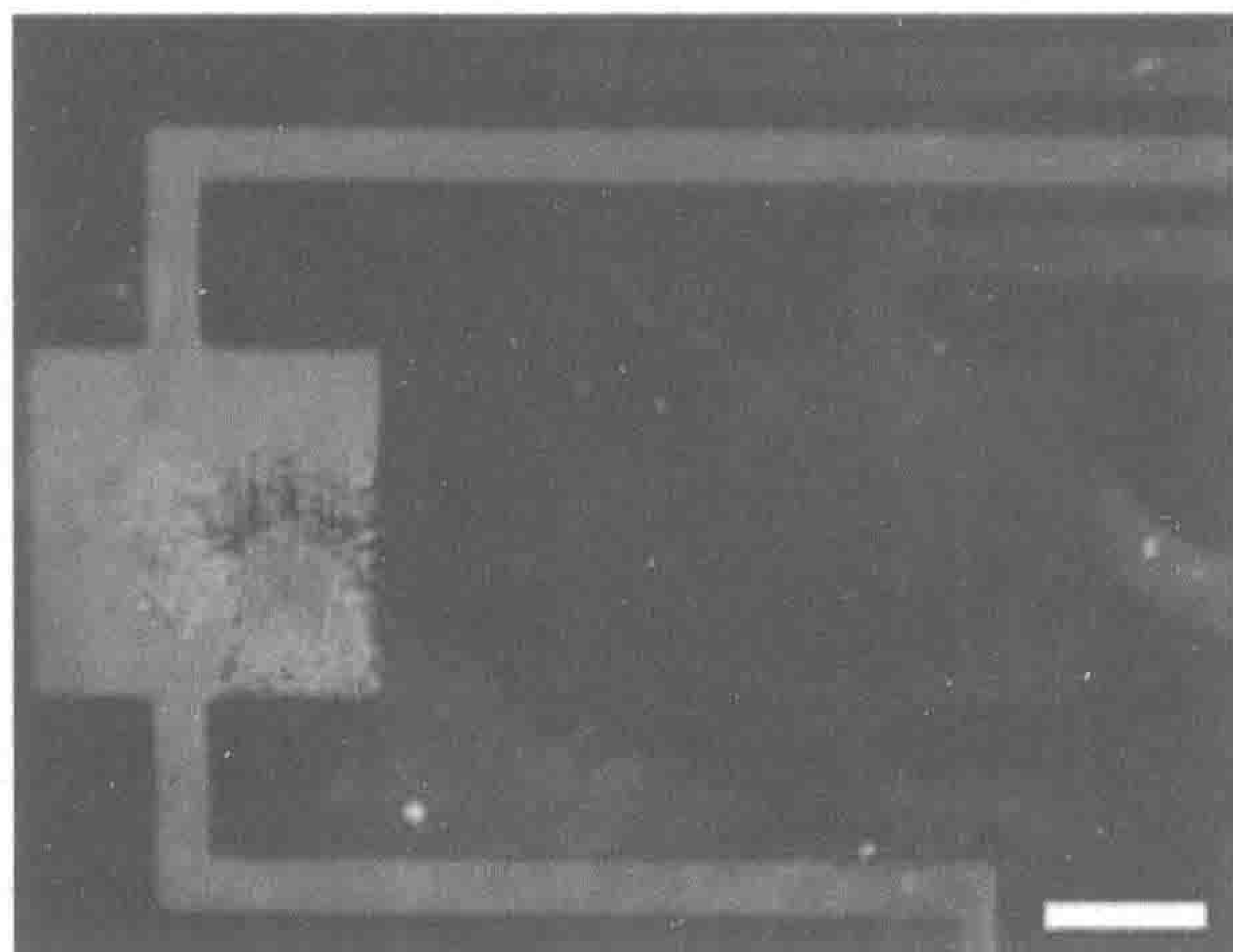


图 5.6　使用 PDMS 模具等离子体处理原生氧化硅载体，异硫氰酸荧光素标记的 S 层蛋白 SbpA 的荧光图像。白色比例尺=50μm（彩图请扫封底二维码）

毛细微模塑技术可以用于简单和中等复杂的结晶 S 层蛋白阵列，从亚微米级至几百微米的临界尺寸的横向涂层。此外，正如涂层 S 层蛋白基底上附着人 IgG 抗体和随后与抗人 IgG 抗原结合所证明的一样，S 层蛋白完全保留天然化学功能[23]。这种多功能 MIMIC 模式技术也可能与固定化技术组合（见 5.3.4 节），例如，用于操控具有良好定位和定向作用的纳米颗粒的结合。

5.3.4　纳米阵列的形成

5.3.4.1　载体的制备

为了获得这些硅晶片可比较的表面特性，通过蒸发，将 1～10nm 厚的 SiO_2 覆盖到标准聚乙酸甲基乙烯脂和碳涂覆的电子显微镜网格上，随后用前面描述的方法，用 O_2 等离子体处理（见 5.3.2 节）。

5.3.4.2　S 层蛋白重结晶

球形芽孢杆菌 CCM2177（0.1mg SbpA/ml 加入缓冲液 C 中）SbpA 溶液用于填充玻璃的孔。接着，将 SiO_2 涂覆的网格水平放置在液体-空气界面，4h 后取出。大多数情况下，在网格上不仅有 SbpA 结晶层，也吸附自组装产物。洗涤 S 层蛋白包被的网格并在 4℃下储存于 Milli-Q 水中。

5.3.4.3 纳米粒子

具有平均直径为5nm的柠檬酸盐固定的金纳米粒子带负电荷。氨基改性的带正电荷的硒化镉（CdSe）纳米颗粒，根据文献[24,25]进行制备（见5.4节注意事项9）。纳米粒子与S层晶格的非共价静电结合，将SbpA包被的网格（具有或不具有附着的S层自组装产物，见5.4节注意事项4）在纳米颗粒溶液中，室温下温育1h并用Milli-Q水洗涤。

5.3.4.4 透射电子显微镜

透射电子显微镜（TEM）分析是通过负染色片但大多数情况下不作制备处理完成的。S层蛋白的结构（晶格常数，对称性）和化学多态性（表面活性功能性基团）使形成的纳米晶体超晶格具有空间控制填料。由于静电相互作用，阴离子柠檬酸盐稳定的金纳米粒子（直径5nm），暴露在S层晶格内表面位点形成了超晶格。与此相反，阳离子半导体纳米粒子（如氨基官能化的CdSe粒子）在S层晶格固相载体外表面形成阵列[26]。

5.3.5 S层支持的脂质膜

5.3.5.1 涂层脂膜的形成

脂质膜（图5.7A）是用1%（*m*/*m*）1,2-二硬脂酸-3-磷脂酰乙醇胺（DPhyPC）的正癸烷溶液制备的[27,28]。储备液储存于−20℃。孔口用溶于氯仿的1,2-二硬脂酸-3-磷脂酰乙醇胺（10mg/ml）预涂，并用氮气干燥至少20min。接着，将隔离室充满电解液（各12ml）。顺池接地，且反池用Ag/AgCl电极与膜片钳放大器连接。在聚四氟乙烯刷上加一滴脂质混合物并轻抚孔口。立即可见膜的形成（见5.4节注意事项10）。随着脂质膜电容测量，膜开始变薄。达到恒定电容后（需要20～40min），就完成了脂质膜的内部参数试验研究。

5.3.5.2 折叠脂质膜的形成

1,2-二硬脂酸-3-磷脂酰乙醇胺溶于正己烷/乙醇（9∶1）。5mg脂质/ml的浓度储备液贮存于−20℃。在膜形成之前至少30min，用一小滴十六烷/戊烷（1∶10）预处理孔口（图5.7B）。两个隔室填充电解质以刚好低于孔为止[29]。2μl脂质储备溶液涂布在每个隔室的水表面，并且使溶剂蒸发至少20min。用注射器将隔室电解液升高到孔上方并形成脂质膜，检测电导和电容（见5.4节注意事项11）。

给定电压的函数测量电流响应，从而提供脂质膜的电容和电导[30,31]。三者电压函数（−40～+40mV，20ms）可以用于确定脂质膜的电容。比容量分别为0.4～0.5μF/cm^{2}和0.6～0.8μF/cm^{2}的涂层和折叠膜[9,11,32,33]（见5.4节注意事项12）。膜电导通常是＜10^{-8}S/cm^2。设置两个内置放大器的贝塞尔滤波器分别为10kHz和1.5kHz电流监测信号。所有实验应在室温下进行（见5.4节注意事项13）。每次实验后，用氯仿、甲醇和乙醇进行彻底清

洗特氟隆孔径，然后用 Milli-Q 纯净水冲洗。

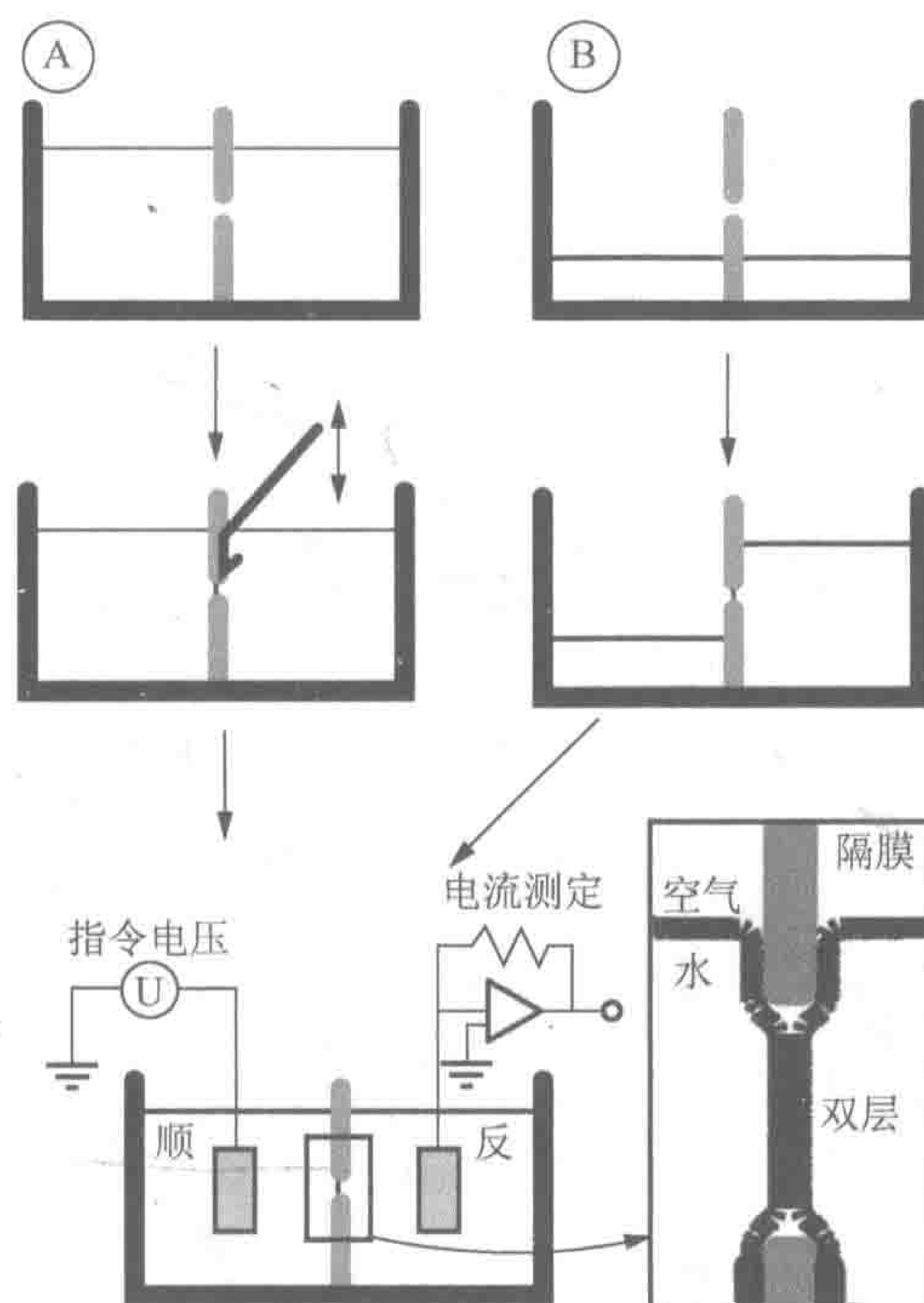


图 5.7　形成（A）的示意图和（B）折叠脂 MEM-期 Brane。左下方是设置（未按比例绘制）的图示，以及插图显示了双层类脂膜的图

5.3.5.3　S 层蛋白 SbpA 和 SbsB 再结晶

形成涂层或折叠脂质膜后，将 S 层溶液小心注入反式隔室中，最终蛋白质的浓度为 0.1mg/ml。缓冲液相同的体积加入到顺式隔离区。根据我们的经验，在脂质膜上 S 层亚基再结晶过程一般在 3h 内完成[34]。如果质膜由来自于球形芽孢杆菌 CCM2177 的 S 层蛋白 SbpA 支持，那么必须加入 10mmol/L 的 $CaCl_2$ 到电解液才能再结晶。另外，嗜热脂肪芽孢杆菌 PV72（图 5.8）的 S 层蛋白 SbsB 的再结晶不需要氯化钙。紧密黏附的 S 层晶格不会影响比电容，而膜的电阻稍有增加[32,35~38]。S 层蛋白的重结晶可以通过透射电子显微镜研究沉淀负染制剂（见 5.2.4.3 节），采用原子力显微镜检测脂类包衣聚合物隔膜（见 5.2.2.4 节）。

S 层蛋白支持的脂质膜优点是增强了长期稳定性[37,38]；抗斜坡电压高达 500mV 甚至更高的稳定性[39]；增加弯曲刚度[40]，因此，抗静水压力梯度有较大刚性[34,35]。所以，有可能用机械敏感性离子通道区分[41~43]，曲率诱导力学活化和流动诱导活化之间 S 层蛋白载体的脂质膜再生[35]。此外，紧紧附着的 S 层晶格允许膜-活性肽完全再生[37,44]，但复杂膜蛋白如α溶血素[36,38,39]也可重构。

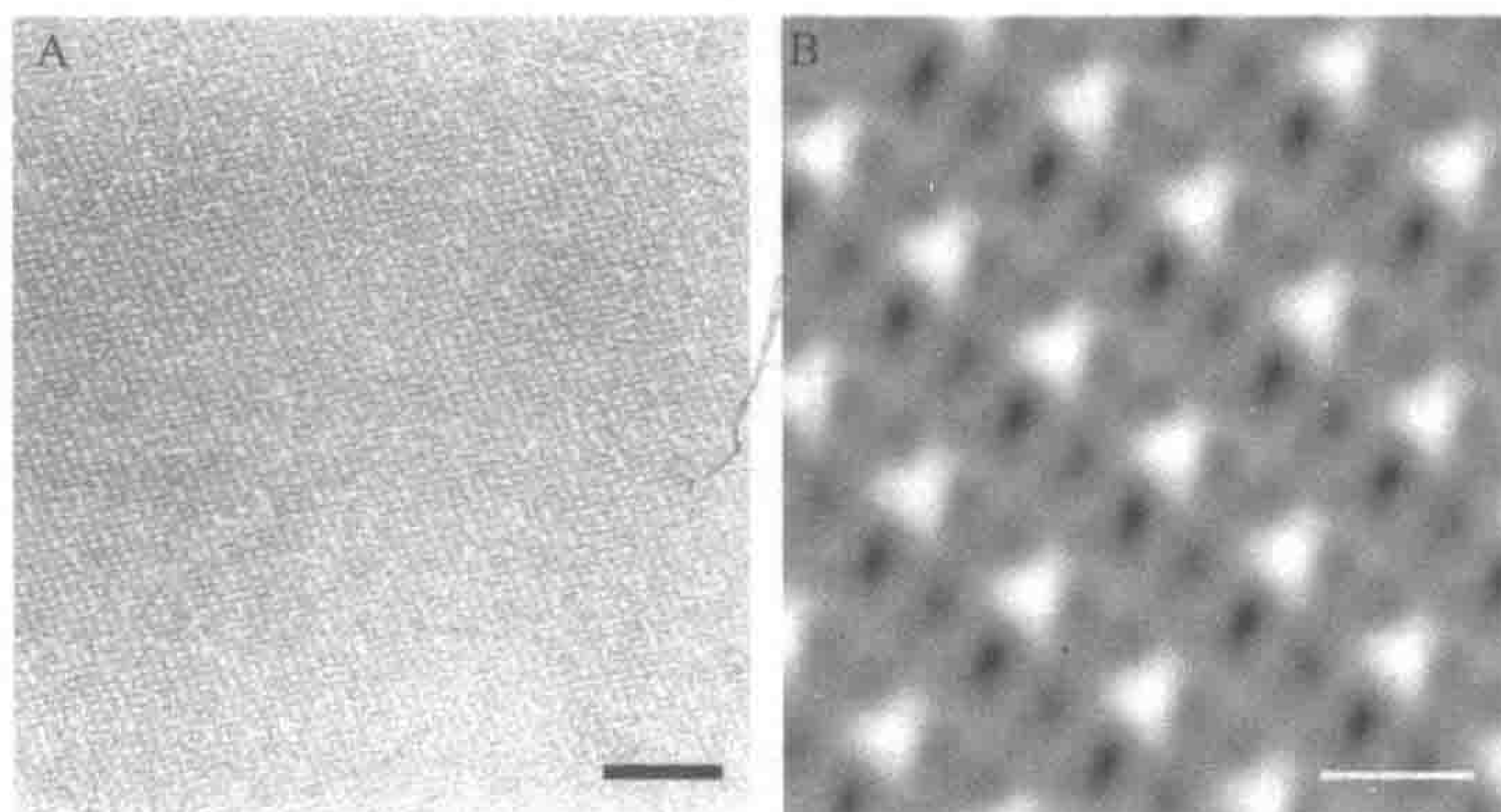


图5.8 （A）从嗜热脂肪芽孢杆菌PV72分离的S层蛋白SbsB在DPhPC/十六烷基胺单层上重结晶，负染制备的电子显微镜照片（摩尔比10∶4）。黑色比例尺=100nm。（B）SbsB斜纹S层蛋白晶格的透射电子显微图像的计算机重建图。白色比例尺=10nm（转载自参考文献[35]并征得许可；©2002，Elsevier Science）

5.4 注 意 事 项

1. 氯化处理，将银线浸入0.1mol/L的盐酸溶液作为阳极，用10mA的电流通过导线5min。

2. 球形芽孢杆菌CCM2177偏爱碱性培养基，因此，必须添加硫酸制备，以维持pH 7.2。

3. 含S层蛋白的溶液应对大体积透析，一般为3L蒸馏水，每次透析用有或没有氯化钙进行。透析之前务必将蒸馏水冷却至4℃。

4. 已证明从许多原核生物单独分离的S层亚基有自组装成整齐晶格的能力，这些晶格与完整细胞上去除干扰剂（如透析）的分离物观察到的结构一样。S层自组装过程导致形成平片层、开放式圆柱体或球体。离子强度、温度、蛋白质浓度和聚合物与自组织的速度和程度相关（综述，参见参考文献[5]～[8]）。

5. 在涂层之前必须小心除去过量的水以防止水膜干扰。

6. 通过的准分子激光光刻ArF（λ=193nm）以100～200mJ/cm^{2}的剂量照射后可完全去除S层蛋白。

7. 用光学显微镜快速填充微米级通道，毛细管填充甚至溶液从模型两端进入也行。

8. 异硫氰酸硫胺素与S层蛋白的游离氨基结合。

9. 通过使用高度沸腾氨基苯甲醚为基质和以三辛基膦作为配位溶剂混合的有机金属合成制备氨基改性的CdSe纳米颗粒。1ml新鲜制备的溶胶，加入少量的甲醇沉淀CdSe纳米晶体。除去上清液后，将这些颗粒转移至5ml的20mmol/L的*N,N*-二甲基-巯基乙基氯化铵和1mmol/L 2-(丁氨基)-己二硫醇溶液中，与仲胺官能化。超声波处理5min产生光学澄清的溶液。

10. 把聚四氟乙烯刷非常紧密地靠近隔室，将脂质轻刷孔口，如果膜破裂，不要滴加新的脂质，再次尝试用特氟龙刷轻刷孔口。

11. 如果没有膜的形成，可以用抽吸泵除去空气-水界面上的脂质，然后用少量脂质再尝试。此外，必须非常小心，所有溶液和电解质都不能有任何灰尘或其他污染物。

12. 脂质膜介电常数取 ε=2.1，相当于长链碳水化合物平均介电常数。

13. 如果湿度过高或天气闷热，膜的形成是非常稀薄，通常膜也不稳定。

致谢

本工作得到了 Ludwig Boltzmann 路德维希·波尔兹曼促进会的支持；获得奥地利科学基金会（项目 P-14419-MOB 和 P-16295-B07）、德国大众汽车基金会（项目 I/77 710）的资助。

参 考 文 献

[1] Sleytr, U.B., Messner, P., Pum, P., and Sa'ra, M. (eds.) (1996) *Crystalline Bactrrial Cell Surface Proteins,* Acdemic, Ausitin, TX.

[2] Sleytr, U.B. (1978) Regular arrays of macromolecules on bacterial cel walls: structure, chemistry, assembly and function. *Int. Rev. Cytol.* 53, 1-64.

[3] Pum, D., Sara, M., and Sleytr, U.B. (1989) Structure, suface charge, and selfassembly of the S-layer lattice from Bacillus coagulants E38-66. J. Bacteriol. 171, 5296-5303.

[4] Sára, M., Pum, D., and Sleytr, U. B. (1992) Permeability and charge-dependent adsorption of the S-layer lattice from *Bacillus coagulans* E38-66. *J. Bacteriol.* 174, 3487–3493.

[5] Sleytr, U.B., Messner, P., Pum, D., and Sára, M. (1999) Crystallinebacterialcell surface layers (S layers): from supramolecular cell structure to biomimetics and nanotechnology. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 1034–1054.

[6] Sleytr, U. B., Sára, M., and Pum, D. (2000) Crystalline bacterial cell surface layers (S-layers): a versatile self-assembly system, in *Supramolecular Polymerization* (Ciferri, A., ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 177–213.

[7] Sleytr, U. B., Sára, M., Pum, D., and Schuster, B. (2001) Molecular nano-technology and nanobiotechnology with two-dimensional protein crystals (S-layers), in *Nano-Surface Chemistry* (Rosoff, M., ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 333–389.

[8] Sleytr, U.B., Sára, M., Pum, D., Schuster, B., Messner, P., and Schäffer, C. (2003) Self assembly protein systems: microbial S-layers, in *Biopolymers*, vol. 7 (Steinbüchel, A. and Fahnestock, S., eds.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 285–338.

[9] Hanke, W. and Schlue, W. R. (1993) Planar lipid bilayers: methods and applications, in *Biological Techniques Series* (Sattelle, D. B., ed.), Academic, London, UK, pp. 24–43.

[10] Alvarez, O. (1986) How to set up a bilayer system, in *Ion Channel Reconstitution* (Miller, C., ed.), Plenum, New York, pp. 115–130.

[11] Benz, R., Fröhlich, O., Läuger, P., and Montal, M. (1975) Electrical capacity of black lipid films and of lipid bilayers made from monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 394, 323–334.

[12] Montal, M. (1974) Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers. *Methods Enzymol.* B 32, 545–554.

[13] Messner, P., Hollaus, F., and Sleytr, U.B. (1984) Paracrystalline cell wall surface layers of different *Bacillus stearothermophilus* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 202–210.

[14] Sleytr, U. B., Sára, M., Küpcü, Z., and Messner, P. (1986) Structural and chemical characterization of S-layers of

selected strains of *Bacillus stearothermophilus* and *Desulfotomaculum nigrificans*. *Arch. Microbiol.* 146, 19–24.

[15] Bartelmus, W.andPerschak, F. (1957) Schnell methodezur Keimzahl bestimmung in der Zuckerindustrie. *Z. Zuckerind.* 7, 276–281.

[16] Pum, D. and Sleytr, U. B. (1995) Anisotropic crystal growth of the S-layer of *Bacillus sphaericus* CCM 2177 at the air/water interface. *Colloids Surf. A* 102, 99–104.

[17] Pum, D., Stangl, G., Sponer, C., Fallmann, W., and Sleytr, U. B. (1997) Deep ultraviolet patterning of monolayers of crystalline S-layer protein on silicon surfaces. *Colloids Surf. B* 8, 157–162.

[18] Pum, D., Stangl, G., Sponer, C., Riedling, K., Hudek, P., Fallmann, W., and Sleytr, U. B. (1997) Patterning of monolayers of crystalline S-layer proteins on a silicon surface by deep ultraviolet radiation. *Microelectron. Eng.* 35, 297–300.

[19] Xia, Y.and Whitesides, G.M. (1998) Softlithography. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, 550–575.

[20] Michel, B., Bernard, A., Bietsch, A., et al. (2001) Printing meets lithography: soft approaches to high resolution patterning. *IBM J. Res. Dev.* 45, 697–719.

[21] Kumar, A., Biebuyck, H. A., and Whitesides, G. M. (1994) Patterning self-assembled monolayers: applications in materials science. *Langmuir* 10, 1498–1511.

[22] Kim, E., Xia, Y., and Whitesides, G. M. (1995) Making polymeric microstrucures: capillary micromolding. *Nature* 376, 581–584.

[23] Györvary, E. S., O'Riordan, A., Quinn, A. J., Redmond, G., Pum, D., and Sleytr, U. B. (2003) Biomimetic nanostructure fabrication: nonlithographic lateral patterning and self-assembly of functional bacterial S-layers at silicon supports. *Nano Lett.* 3, 315–319.

[24] Talapin, D. V., Rogach, A. L., Kornowski, A., Haase, M., and Weller, H. (2001) Highly luminescent monodisperse CdSe and CdSe/ZnS nanocrystals synthesized in a hexadecylamine-trioctylphosphine oxide-trioctylphospine mixture. *Nano Lett.* 1, 207–211.

[25] Talapin, D. V., Rogach, A. L., Mekis, I., Haubold, S., Kornowski, A., Haase, M., and Weller, H. (2002) Synthesis and surface modification of amino-stabilized CdSe, CdTe and InP nanocrystals. *Colloids Surf. A* 202, 145–154.

[26] Györvary, E., Schroedter, A., Talapin, D. V., Weller, H., Pum, D., and Sleytr, U. B. (2004) Formation of nanoparticle arrays on S-layer protein lattices. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 4, 115–120.

[27] Mueller, P., Rudin, D. O., Tein, H. T., and Wescott, W. C. (1962) Reconstitution of cell membrane structure *in vitro* and its transformation into excitable systems. *Nature* 194, 979–981.

[28] Fettiplace, R., Gordon, L. G. M., Hladky, S. B., Requena, J., Zingsheim, H. P., and Haydon, D. A. (1975) Techniques in formation and examination of black lipid bilayer membranes, in *Methods of Membrane Biology*, vol. 4 (Korn, E. D., ed.), Plenum, New York, pp. 1–75.

[29] Montal, M. and Mueller, P. (1972) Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 3561–3566.

[30] Darszon, A. (1983) Strategies in the reassembly of membrane proteins into lipid bilayer systems and their functional assay. *J. Bioenerg. Biomembr.* 15, 321–334.

[31] Schindler, H. (1989) Planar lipid-protein membranes: strategies of formation and of detection dependencies of ion transport functions on membrane conditions. *Methods Enzymol.* 171, 225–253.

[32] Schuster, B.and Sleytr, U.B. (2000) S-layer supported lipid membranes.*Rev. Mol. Biotechnol.* 74, 233–254.

[33] Tien, H.T.and Ottova, A.L. (2001) The lipid bilayer concept and its experimental realization: from soap bubbles, kitchen sink, to bilayer lipid membranes. *J. Membr. Sci.* 189, 83–117.

[34] Schuster, B., Sleytr, U. B., Diederich, A., Bähr, G., and Winterhalter, M. (1999) Probing the stability of S-layer-supported planar lipid membranes. *Eur. Biophys. J.* 28, 583–590.

[35] Schuster, B.and Sleytr, U.B. (2002) The effect of hydrostatic pressure on S-layer supported lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1563, 29–34.

[36] Schuster, B. and Sleytr, U. B. (2002) Single channel recordings of hemolysin reconstituted in S-layer-supported lipid bilayers. *Bioelectrochemistry* 55, 5–7.

[37] Schuster, B., Pum, D., and Sleytr, U. B. (1998) Voltage clamp studies on S-layer-supported tetraether lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1369, 51–60.

[38] Schuster, B., Pum, D., Braha, O., Bayley, H., and Sleytr, U. B. (1998) Self-assembled-hemolysin pores in an S-layer-supported lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta* 1370, 280–288.

[39] Schuster, B., Pum, D., Sára, M., Braha, O., Bayley, H., and Sleytr, U. B. (2001) S-layer ultrafiltration membranes: a new support for stabilizing functionalized lipid membranes. *Langmuir* 17, 400–503.

[40] Hirn, R., Schuster, B., Sleytr, U. B., and Bayerl, T. M. (1999) The effect of S-layer protein adsorption and crystallization on the collective motion of a lipid bilayer studied by dynamic light scattering. *Biophys. J.* 77, 2066–2074.

[41] Chang, G., Spencer, R. H., Lee, A. T., Barclay, M. T., and Rees, D. C. (1998) Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel. *Science* 282, 2220–2226.

[42] Jones, S. E., Naik, R. R., and Stone, M. O. (2000) Use of small fluorescent molecules to monitor channel activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 208–212.

[43] Booth, I. R. and Louis, P. (1999) Managing hypoosmotic stress: aquaporins and mechanosensitive channels in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 166–169.

[44] Schuster, B., Weigert, S., Pum, D., Sára, M., and Sleytr, U.B. (2003) Newmethod for generating tetraether lipid membranes on porous supports. *Langmuir* 19, 2392– 2397.

[45] Sleytr, U.B., Sára, M., Pum, D., and Schuster, B. (2001) Characterization and use of 2D protein crystals (S-layers). *Prog. Surf. Sci.* 68, 231–278.

第6章　自组织肽β结构纤维蛋白的折叠

Anna Mitraki, Mark J. van Raaij

概　　述

天然纤维蛋白包括以天然材料如羊毛和蚕丝存在的家族，以组织成分如胶原蛋白和弹性蛋白存在，或以病毒和噬菌体黏附素形式存在。由于它们的机械性能和弹性性质，使科学家和工程师长期迷恋并作了相当大的努力，试图产生有天然蛋白灵感的人工材料。为了实现这些目标，必须了解它们的结构、折叠和装配性能。然而，由于其复杂性，获得这些蛋白质的结构信息通常相当困难。本章中，我们侧重于纤维蛋白的特定家族：三聚体、β链病毒黏附素。我们介绍了导致稳定结构域可结晶化折叠的策略，和正在出现的新的结构动机。我们还讨论了从这些动机中衍生的自组装肽。最后，我们综述了基于这些新结构动机，设计新颖宏观材料及纳米级纤维目的物的可能性。

关键词：纤维蛋白；β结构；蛋白质折叠；三股β三维螺旋；三联β二维螺旋；自组装肽；淀粉样纤维

6.1　导　　论

天然纤维蛋白，由三螺旋胶原蛋白、α-螺旋盘绕结构或β结构基序[1~3]组成。胶原蛋白的三螺旋和盘绕卷曲，已从生物化学、结构和生理学观点进行了广泛的研究，本章中不再讨论。直到最近，仍然只有很少关于结构和折叠信息，适应于β结构的纤维蛋白。其内在结构的复杂性和众所周知的聚集倾向，使β结构蛋白折叠和处理更加困难。

病毒使用一类β结构的纤维蛋白作为它们的附着细胞器[4~6]。通常它们由病毒衣壳附属的 N 端区域、一个中心轴和一个与 C 端受体结合的或化学传感器领域[7,8]的同型三聚体组成。这个长而细的纤维轴似乎充当病毒抵达的机械装置。这些纤维蛋白经历了恶劣的细胞外环境生存进化；因此，它们是非常稳定的蛋白质，能抵抗十二烷基磺酸钠（SDS）、尿素、温度和蛋白酶的攻击[9]。轴部件的一级序列通常包括重复序列，提示这些部件折叠成规则的、重复的结构。

由于其细长和非对称性质，这些蛋白质很难内结晶。因为它们抗蛋白酶，蛋白质酶解区域不能被分离。然而，研究它们的折叠途径可以揭示折叠中间体，包括稳定的区域；

这些稳定域可以结晶，并可能导出结构信息[10~12]。使用这样的策略，揭示这些病毒黏附素的一些稳定区域结构有β结构新基序[13~16]。我们相信，这种策略能够用于其他未知结构纤维蛋白的研究。在本章中，我们强化了这样的战略，并讨论了两种情况下组装的结构、折叠和组件的两个研究案例：人腺病毒的纤维和噬菌体 T4 的短尾纤维。在这一区域，噬菌体 P22 纤维结构、折叠和组装，之前已有广泛的综述[17,18]，在此不再讨论。最后，我们讨论构建元件和折叠途径的知识，从而引导具有可控维度和性能的新型纳米纤维的合理设计。

6.2 方　法

6.2.1 伸展研究和稳定结构域鉴定

对于许多β结构纤维蛋白来说，完全的伸展需要考虑像球蛋白完全相似的变性处理，如温度高于 70℃。为了寻找长期活动和稳定的伸展中间体，需要探索温和变性的条件。这包括较低温和中等浓度（0.1%～0.5%）去污剂（如 SDS）或变性剂（如尿素或盐酸胍）。我们研究了迄今为止病毒黏附素的一个有吸引力的特性是，天然三聚体不能被 SDS 在环境温度下解离；只有经过加热才能解离成单体。天然蛋白质与很少的 SDS 结合，缓慢地迁移到含有 SDS 的聚丙烯酰胺凝胶独特位置[10,11]。这种对 SDS 的抗性特别有用，因为直接用 SDS-PAGE 电泳能将部分折叠链和错误折叠链的天然三聚体分离。部分展开，但不是解离的链，通常在 SDS-PAGE 凝胶上可直接观察到[10,11]。

大纤维蛋白的另一个优点是，在电子显微镜中可看到它们的天然形式，也可直接看到稳定的、部分折叠的中间体[11]。为了确定未折叠部分和稳定结构域之间的边界结构，使用限制蛋白质水解的方法，即利用蛋白酶在温和变性的条件下起作用。蛋白酶如胞内蛋白酶谷氨酸 C、胞内蛋白酶赖氨酸 C、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、弹性蛋白酶可在 0.1% SDS 中起作用（胞内蛋白酶谷氨酸 C 能够在高达 0.5% SDS 中作用）。胞内蛋白酶谷氨酸 C、胞内蛋白酶赖氨酸 C 和胰蛋白酶可以耐受高达 5mol/L 尿素的变性条件。可以使用具有对比作用特异性的两种蛋白酶，以便评估确切的边界。随后，可以通过 N 端测序或质谱法来确认稳定片段的特性。另一种选项是，嗜好中温的纤维部分的伸展；冷却样品不再折叠；然后是，蛋白酶在最适、较低温度条件下蛋白质水解过程。如果金属离子、辅因子等已知因素为蛋白质所必需，它们可能有助于区域的稳定性。因此，有辅因子和没有辅因子都有利于蛋白质水解结果的比较（见 6.2.5 节）。图 6.1 显示上述策略用于普通纤维状蛋白质的各种步骤。

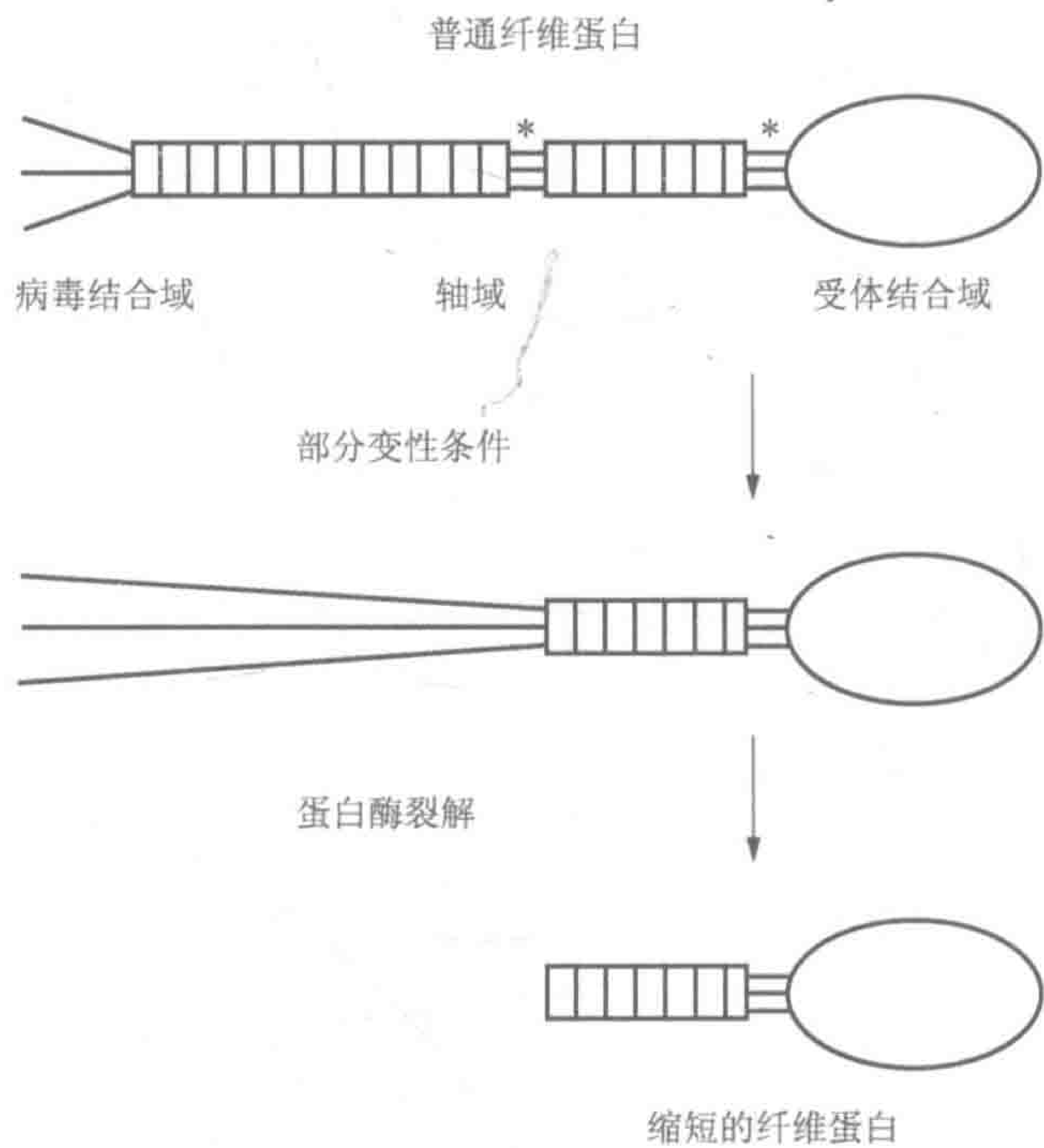


图 6.1　适合结晶产生缩短的纤维蛋白片段的广义策略。顶部显示一个通用的纤维蛋白的 N 端的病毒结合域、中心轴域和 C 端受体结合结构域。*表示铰链区。在部分变性（包括升高温度或增加中浓度清洁剂或变性）条件下，该蛋白质部分伸展。然后加入蛋白酶，切除不折叠结构域。注意，尽管这里显示 N 端不折叠，但不折叠也可以发生在其他地方

6.2.2　纤维蛋白的重组产生

在用重组方法产生纤维蛋白的过程中，必须考虑到获得不溶性沉淀物（包涵体）的危险。为了避免包涵体的形成，应该应用标准的方法[19]。然而，纤维蛋白可能带来一些额外的困难。细胞伴侣分子可以参与折叠和病毒纤维的组装，例如，需要呼肠孤病毒纤维才能形成热休克蛋白 70（Hsp70）和热休克蛋白 90 （Hsp90）[20,21]。有时特定分子伴侣，也用于确保纤维蛋白的正确折叠和装配。6.2.5 节使用特定的噬菌体编码分子伴侣（gp57），我们介绍了 T4 短纤维。缺乏这种蛋白质，T4 的短纤维在大肠杆菌中表达时，形成不溶性聚集物；它们正确折叠成三聚体状态需要 gp57 共表达[22]。gp57 也是长尾纤维的折叠和组装必需物质，但其作用机制目前尚不清楚。因此，当分子伴侣必须存在时，目的纤维状蛋白质，必须要在细胞或病毒编码蛋白伴侣存在下才能超量表达。

6.2.3　结晶

纤维蛋白原则上，可以使用相同的策略如球状蛋白，尝试不同的沉淀剂、pH、添加剂和温度进行结晶。然而，病毒或噬菌体的其余部分，可能缺乏纤维蛋白病毒-结合区，没有折叠并导致特异聚集从而阻碍结晶。此外，由于它们通常具有弯曲或纽结纤维的特

异性区域，在结构成功测定、晶体电子密度混乱无序区域等的情况下，导致结晶成功率低。稳定区域的确定，消除了一些结合区域或全部结合区域，极大帮助了衍射晶体的获得。如球状蛋白一样，结晶成功重要的是纯度、构象的同源性和获得合理量蛋白质（0.5mg以上）的能力及相对高的浓度（5～50mg/ml）。

6.2.4 研究案例 1：腺病毒纤维

腺病毒引起人类呼吸道、胃肠道和眼部感染[23]。来自二十面体衣壳中的 12 个顶部突出纤维（平行同源三聚体，每个单体含 582 个氨基酸），它们负责细胞附着（图 6.2）。C 端球状头结构域附着于细胞受体上[7]。中心轴包含有重复序列基序与不变甘氨酸或脯氨酸和一个保守的疏水残基[24]。在一些血清型中有 30nm 长的轴，有 22 个重复特征。短的 N 端部分（大约 45 个残基）的纤维嵌入到病毒衣壳中。

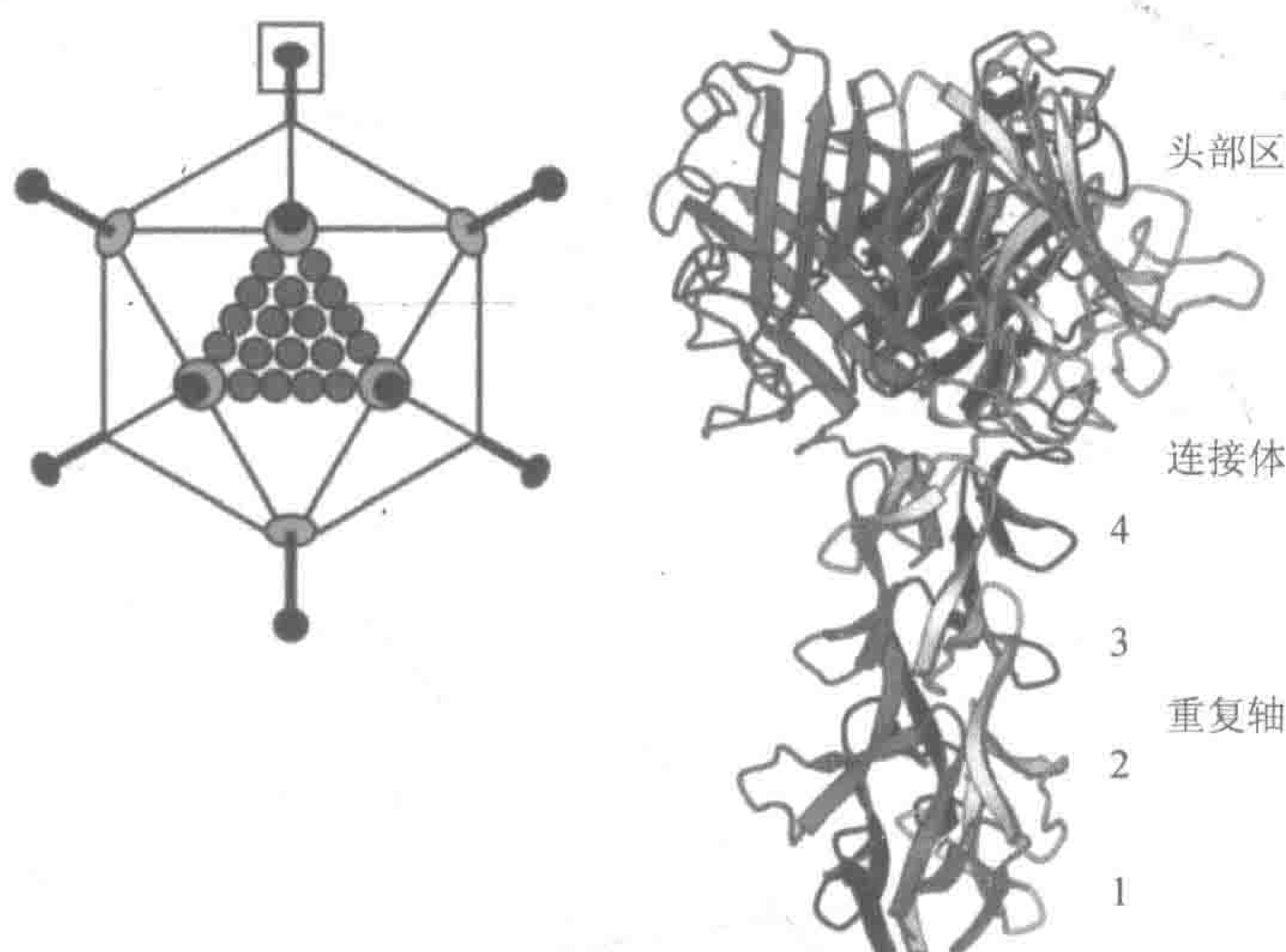


图 6.2　腺病毒示意图（左边）和腺病毒 2 型结构纤维稳定片段（右边）。标记的头部区、连接区和重复轴。全长的纤维蛋白存在高达 22 重复区。纤维结构是盒状纤维的一部分。所示的腺病毒颗粒约为 80nm 宽（不包括纤维，能够测量达到每个为 35nm），显示结构部分大约长 10nm。这些数字来自于 Molscript [56] 和 PDB 蛋白质结构数据库（http://www.rcsb.org）。其中一个条链显示黑色和其他两条为灰色。在腺病毒 2 型稳定的片段在 PDB 代码为 1QIU

整个腺病毒 2 型纤维[11]伸展实验可以鉴定长寿伸展中间体。在 SDS 存在和适度温度（4～22℃）情况下，纤维从 N 端开始部分伸展，电子显微镜下可观察到具有 C 端头及轴结构部分的稳定中间体堆积。在含 SDS-PAGE 凝胶中可直接观察到这种伸展的中间体，泳动比原生三聚体慢[11]。由限制性蛋白水解消化伸展部分和 N 端测序后，稳定结构域被确定残基跨度为 319～582。该结构域随后被克隆到大肠杆菌中表达；已经获得正确折叠的三聚体，它的成功结晶解决了它的晶体结构问题[14]。

晶体结构揭示了形成的三股β-螺旋的四轴重复序列折叠（图 6.2）。基本主体结构是一个链-环-链图形；这些图形由包含保守甘氨酸（在轴的溶解部分）或脯氨酸（轴的其

余部分）在内的 2 型β-转角相连。三条链彼此环绕产生高度缠结结构（三分之一单体表面区埋入三聚体内）。为了 C 端一个重复序列叠加到下一个重复序列，必须沿着约 1.3nm 轴翻译并顺时针转动大约 50°。该结构的稳定特征是中央纵向疏水的核心，每个轴重复序列贡献 3 个疏水氨基酸侧链；由两个额外的保守疏水性侧链形成更大半径的疏水性补丁；链内和链间含有氢键。在链-环-链图形中的环有一个可变序列并被溶剂暴露；这些溶剂暴露的环是目前为止已知的纤维折叠的唯一结构特征。

晶体结构的类型 5[25]、类型 2[26]、类型 12[27]和类型 3[28]纤维头部结构域的晶体结构是已知的，除了环区的差异几乎相同。每个纤维头单体含有一个反平行β三明治，两个四链β折叠以约 30°角包装在一起而形成。在球状三聚体中，β三明治由三叶螺旋组成（图 6.2）。三聚体头部在单体-单体界面上的三聚体的侧链含有受体结合位点[27]。由于亲和力[29]的活性增强，每个三聚体的三个受体结合位点紧密地结合在一起。头部和轴域（残基 393～398）之间的连接区可能增加这两个域之间的灵活性；在稳定片段[14]的晶体结构中，两区的中央三重轴线的确偏移了约 2°。这种灵活性在受体结合中的作用目前还尚不清楚。

有趣的是，通过缺失突变体的胰蛋白酶消化获得了哺乳动物呼肠孤病毒纤维（σ1 亲蛋白）C 端片段，它的结构已经清楚[30]。β结构的球状头部域结构呈类似腺病毒纤维头和 3 个三股β-螺旋轴重复序列。

6.2.5　研究案例 2：噬菌体 T4 短尾纤维

噬菌体 T4 的作用就像一个自供电纳米级注射器。这也是已知最大和最复杂的病毒之一，它含有超过 40 个不同的结构蛋白[31]。这是非常有效的，因为一个颗粒通常足以高效地感染其大肠杆菌宿主并在 37℃ 30min 内产生数以百计的子代噬菌体。感染期间，长尾纤维首先结合细菌脂多糖或外膜蛋白 C（OmpC）。一旦被至少 3 个长尾纤维绑定，噬菌体基板将构象从六边形变化为星形[32]。这导致短尾纤维延伸并结合到细菌脂多糖核心区（图 6.3）。下一步是外尾管的收缩，驱动内尾管穿过细菌膜（图 6.3）。再通过[33]具有溶菌酶活性的针给内尾管盖帽，帮助其穿过细菌细胞壁。噬菌体 DNA 通过尾管进入细菌并直接产生子代噬菌体。

长尾纤维由 4 种不同蛋白质的复合物组成[34]。由 gp34 三聚体（每个亚基 1289 个氨基酸）形成近端半个纤维（或“大腿”），铰链（或“膝盖”）包含 gp35（372 个氨基酸）单体，末端半个纤维（或“胫骨”）由 gp36 和 gp37 的三聚体组成。gp37（每个单体 1026 个残基）负责受体结合和构成大部分末端一半的纤维，gp36（每个单体 221 个氨基酸）与 gp37 三聚体连接形成铰链。长尾纤维蛋白晶体结构还尚未见报道。

短尾纤维是由单一的蛋白质，527 个残基的 gp12 形成平行同源三聚体所组成。在大肠杆菌中 gp12 与 T4 噬菌体蛋白 gp57 共表达[22]，随后纯化产生合适质量、纯度和溶解性的可用材料。然而，尽管做了大量的试验，但还不能从这种材料中获得晶体。像腺病毒纤维一样，N 端是柔性的和（或）不稳定的，37～41 个氨基酸在 37℃被消化掉了。这个共同模式可能因为两种蛋白质 N 端附着于病毒衣壳或附着在天然环境中的基板上，因此，使分离纯化物不稳定。进一步增加温度到 56℃，随后蛋白酶消化，首先

83 个氨基酸被消除，第二切割位点是 Arg-395 后未覆盖的位置。这种热稳定蛋白酶片段成功地结晶[12]。除了在二价锌离子存在外，以相同方式制备的另一个片段，导致只有 N 端 83 个氨基酸被删除的片段。产生的晶体结构[15,16]可以识别几种新的折叠，尽管由于静电干扰，结晶蛋白质部分没有见到晶体电子密度。真实的情况是 85～245 氨基酸在第一片段，85～329 残基在第二片段。尽管如此，结合晶体结构使我们画出了 246～527 位氨基酸结构（图 6.3）。

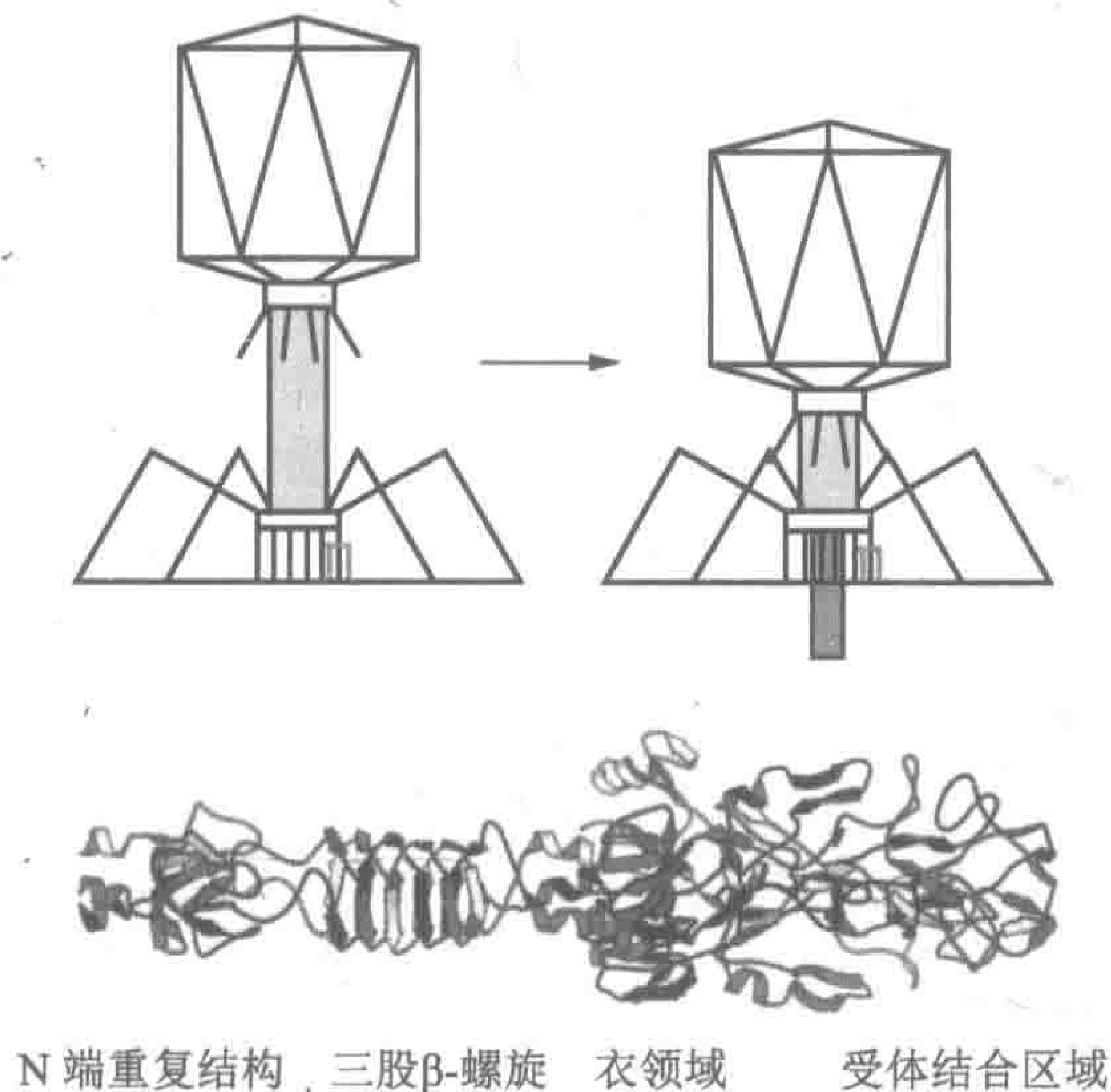


图 6.3　非收缩噬菌体 T4（左上）和收缩 T4（右上）示意图。显示清晰 4/6 纤维蛋白和长尾纤维。非收缩 T4 颗粒约 300nm 高。底部是噬菌体 T4 尾短纤维（来自 PDB 编码 1H6W 和 1OCY 组合）的已知域的复合结构。链中显示黑色和灰色两个部分。受体结合结构域、衣领域、三重β-螺旋和可溶 N 端重复标记。5 个多 N 端重复结构存在于全长蛋白质中。在示意图中，尾短纤维，其中已知的结构部分为灰色盒状结构。全长短尾纤维为 35nm 长，该结构部分大约为 15nm

N 端结构域包含 6 个 17-残基重复序列组成含有疏水残基如丙氨酸和苏氨酸，并含有谷氨酸残基。这些重复序列中，一个已在晶体结构（残基 255～271）中分解；它主要包含由溶剂暴露 1 型β-转角连接的两个β链。这些重复序列的 8 个也存在于 gp34 中，一个存在 gp37 中。因为重复序列之间的残基不会改变，重复序列之间的空间是可变的，显示 T4 的纤维轴的结构，并不像腺病毒纤维轴的结构一样有规律。

该区域包括 290～327 位氨基酸形成右旋三重链β-螺旋，其中每个单体在两个 360°转角中贡献 6 个六残基β链（图 6.3）。各β链的 2 个氨基酸有助于疏水性侧链形成中心疏水核心，三重β-螺旋框架是通过链间的β链之间的氢键固定在一起。在β-螺旋结构域中，每个单体 57%表面埋在复合物中。有趣的是，在尾部管底部的针是 gp5 的三聚体，还包含一个三重β-螺旋，但 8 个残基β链更长并组成了 7 个 360° 转角[33]。

箭头形 C 端头结构域具有一个球状衣领域[15]和一个强交织含锌受体结合结构域[16]。与噬菌体 T4 gp11 部分有弱结构同源性的衣领域，提示可能有远亲进化关系。还有另一个唯一折叠的受体结合域。它包含一些常规的二级结构元件，尽管能满足稳定蛋白质折叠的正常要求，但是它需要一个疏水核和氢键。在三聚体受体结合结构域的中心，我们

发现了一个单一的锌离子，通过来自每个单体的两个组氨酸残基NE2原子八面体配位，没有锌离子时，该结构域在56℃伸展，而有锌时它不会伸展。

6.3 自组装肽

最近已经证明，许多由天然蛋白序列衍生的肽能自组装成β结构的超分子组件[35,36]。这些超分子组件可以采用原纤维、管、片或单层形式[37]作为具有潜在应用价值的生物材料。它们用于包埋和递送治疗剂的载体，或作为细胞附着的生物支架或生物矿化模板[38,39]。从β结构和极其稳定的天然纤维蛋白衍生的重复序列，如病毒黏附素，当然是能自我组装成纳米纤维的设计肽是非常有吸引力的候选材料。对于理性设计来说，天然蛋白晶体结构的信息是非常重要的因素，然而，正如我们将要看到的一样，这些信息需要与折叠和装配信息联系在一起。

与腺病毒纤维重复轴3和4的序列一致的合成肽（图6.2），不适合没有头部结构的三重β-螺旋构象。相反，他们自组装加长，无支链的原纤维可以达到微米级。这些纤维被称作淀粉样蛋白的原纤维型，采用交叉β结构，即一种结构位于与纤维轴垂直的β链[40,41]。腺病毒头结构域是三聚体化必不可少的，因为发现这部分的缺失或突变会阻碍体内三聚体聚合[42,43]。这个区域是三条链正确排列和组装必需的注册信号，如同在胶原蛋白折叠中的原胶原蛋白区域[44]或噬菌体T4纤维蛋白的C端结构域[45]一样。这个在β-螺旋桨构象中的短（27个氨基酸）结构域作为纤维蛋白N端结构域三重卷曲螺旋的正确三聚体聚合模板（可看到图6.3噬菌体T4的粒子的“衣领”突出的纤维蛋白纤维）。注册信号通常被用来确保纤维蛋白的正确折叠和组装，并纳入基于重复纤维序列的工程纤维结构的账户。如果期望采用天然结构的构建工程，则在设计中必须包括注册信号。否则，重复序列的不注册聚合将产生不同结构、不同属性的纤维。但是，重要的是要记住，这些特性本身令人感兴趣，可用于不同的应用领域。

细菌表达也必须仔细考虑肽合成的优势和劣势。短肽（达到约40个氨基酸）是易于设计和合成的；然而，获得大规模化学合成肽通常要比重组方法产生的蛋白质更昂贵。化学合成的另一优点是可以肽与非肽部分如烷基链相结合创建混合结构。最近介绍了这样的混合结构由亲水肽与设计的烷基链连接组成用于生物矿化作用。它们可以组织成圆筒状微粒，表面组织上的磷酸化丝氨酸残基沉积的钙离子，产生羟磷灰石纳米纤维[46]。

6.4 应用

材料科学和纳米技术中已经首次实现β结构，病毒纤维蛋白的应用。这些蛋白质对于设计具有特定尺度和性能的纤维纳米蛋白，以及制造新颖的生物相容性和生物可降解材料非常有用。试验性基因治疗工程纤维的构建是另一个涉及腺病毒纤维迅速发

展的领域。

新基因治疗载体正在设计某些组织的特异性靶，为此目的的纤维需要定向改性。这个快速发展领域最近提供了丰富的相关信息，对制造腺病毒纤维有了深刻的认识（见参考文献[47]）。已经证明，通过多种方式对蛋白质进行改性仍然可以正确折叠。轴的长度可以增加 9 个重复结构[48]，还可以在环中或 C 端插入其他受体结合结构域[47]。在纽结（球状突出物）或插入一些或许多重复轴结构钮结的杂交腺病毒纤维已被外源三聚结构域所代替，已纳入基于腺病毒试验性基因治疗的载体[47]。

晶体结构应用不久，通过基因重组技术就产生了具有腺病毒轴重复序列的人工（宏观）纤维。O'Brien 等设计了具有纤维轴重复序列构件的聚合物，该聚合物由细菌以包涵体形式表达。重新折叠、纯化和结网后，他们认为获得的纤维属性“相似于商业纺织纤维”[49]。虽然对这种材料没有详细的结构和组装研究，但粉末衍射模式与拉曼研究一起表明，这些纤维可能通过β交叉形成淀粉样构象[49,50]。Edward Goldberg 研究小组开拓了基于噬菌体 T4 长纤维蛋白 gp34 和 gp37 的纳米结构[51]。他们的策略是：第一，设计自组装蛋白质棒单位；第二，在这些蛋白质棒精确的位置插入功能性基团，不干扰折叠和装配；第三，将这些官能棒组装成二维或三维纳米阵列。gp34 和 gp37 三聚体均为 70nm 长。gp12 和腺病毒纤维或许也可用于这一目的；两者都是 35nm 长。

问题是，制成的β结构纤维有多长？对腺病毒来说，可以在体内添加 9 个重复结构（总长度达到 45nm）[48]。加入更多的重复序列可能比较困难，因为在 C 端三聚结构域被合成、折叠完成时，N 端必须保持分开，并把三聚结构域放在 N 端上可能会导致大肠杆菌中蛋白质合成的问题。

6.5　结　　论

在本章中我们总结了最近产生的几种病毒构件和噬菌体纤维蛋白的 X 射线结构策略。通过基于晶体结构的合理设计并提供折叠需要考虑的因素，使用这些构件构建就可获得人造纳米纤维结构。

许多病毒和噬菌体纤维蛋白的结构仍然没有搞清楚。在不久的将来，这些天然纤维蛋白和它们的相互作用伙伴（伴侣分子和受体），进一步的结构信息将变成适用资源。这些附加结构信息和最终出现的新模式，将为稳定的三聚体病毒纤维工程材料提供一个健全的基础。

组合来自这些纤维的各种模式和构件，制造人工融合蛋白是纤维纳米结构设计的下一轮挑战。在此方向上已经实施了第一步：T4 纤维蛋白（27 个氨基酸）的三聚体模式，可以融合到各种蛋白质的纤维部分，范围从 T4 的短尾纤维到产生稳定三聚体蛋白质的胶原螺旋[52,53]。Stetefeld 等[54]测定了与三聚作用模式纤维蛋白融合的人工胶原蛋白三螺旋。其结构显示，交错的胶原蛋白的三螺旋（不含中央三倍轴），容纳了三倍 60°弯曲对称折叠。一种融合蛋白，携带三聚结构域加上大部分卷曲螺旋的纤维蛋白，也成功地与两个最多 N 端重复序列的腺病毒纤维轴融合。存在于这两个融合伴侣中的接头序列

（SQNV）用于这个结构，以避免基序之间潜在的结构矛盾[55]。这些实例证明，只要提供适当的连接臂，不同于三重β-螺旋的、盘绕卷曲的纤维蛋白模式重组就将是可行的。

我们已经介绍的策略强调，β结构纤维蛋白折叠和装配一些综合发展趋势。我们相信，如果密切注意未知结构的其他纤维蛋白，那么这些策略是有益的。但是，要记住一件重要的事情，即每个蛋白质可能是不同的；只有严格和详细地了解其自身折叠和装配途径，才能产生结构信息和基于这些信息进行进一步的合理设计。

致谢

我们感谢国家原子能材料委员会科学研究中心的支持。本项目的研究人员拉蒙-卡哈尔的 Mark van Raaij 获得西班牙科技部的赞助。

参 考 文 献

[1] Beck, K. and Brodsky, B. (1998) Supercoiled protein motifs: the collagen triple- helix and the alpha-helical coiled coil. *J. Struct. Biol.* 122, 17–29.

[2] Jenkins, J. and Pickersgill, R. (2001) The architecture of parallel β-helices and related folds. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 77, 111–175.

[3] Mitraki, A., Miller, S., and van Raaij, M. J. (2002) Review: conformation and folding of novel beta-structural elements in viral fiber proteins: the triple beta- spiral and triple beta-helix. *J. Struct. Biol.* 137, 236–247.

[4] Iwashita, S. and Kanegasaki, S. (1976) Enzymic and molecular properties of base-plate parts of bacteriophage P22. *Eur. J. Biochem.* 65, 87–94.

[5] Philipson, L., Lonberg-Holm, K., and Petterson, U. (1986) Virus-receptor interaction in an adenovirus system. *J. Virol.* 2, 1064–1075.

[6] Riede, I. (1987) Receptor specificity of the short tail fibres (gp12) of T-eventype *Escherichia coli* phages. *Mol. Gen. Genet.* 206, 110–115.

[7] Ruigrok, R.W.H., Barge, A., Albiges-Rizo, C., and Dayan, S. (1990) Structure of adenovirus fiber. II. Morphology of single fibers. *J. Mol. Biol.* 215, 589–596.

[8] Makhov, A. M., Trus, B. L., Conway, J. F., Simon, M. N., Zurabishvili, T. G., Mesyanzhinov, V. V., and Steven, A. C. (1993) The short tail-fiber of bacteriophage T4: molecular structure and a mechanism for its conformational transition. *Virology* 194, 117–127.

[9] King, J. and Laemmli, U. K. (1971) Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 62, 465–477.

[10] Chen, B. and King, J. (1991) Thermal unfolding pathway for the thermostable P22 tailspike endorhamnosidase. *Biochemistry* 30, 6260–6269.

[11] Mitraki, A., Barge, A., Chroboczek, J., Andrieu, J. P., Gagnon, J., and Ruigrok, R. W. H. (1999) Unfolding studies of human adenovirus type 2 fiber trimers: evidence for a stable domain. *Eur. J. Biochem.* 264, 599–606.

[12] van Raaij, M. J., Schoehn, G., Jaquinod, M., Ashman, K., Burda, M. R., and Miller, S. (2001) Identification and crystallisation of a heat- and protease-stable fragment of the bacteriophage T4 short tail fibre. *Biol. Chem.* 382, 1049–1055.

[13] Steinbacher, S., Seckler, R., Miller, S., Steipe, B., Huber, R., and Reinemer, P. (1994) Crystal structure of P22 tailspike protein: interdigitated subunits in a thermostable trimer. *Science* 265, 383–386.

[14] van Raaij, M. J., Mitraki, A., Lavigne, G., and Cusack, S. (1999) A triple beta-spiral in the adenovirus fiber shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein. *Nature* 401, 935–938.

[15] van Raaij, M. J., Schoehn, G., Burda, M. R., and Miller, S. (2001) Crystal structure of a heat- and protease-stable part

of the bacteriophage T4 short tail fibre. *J. Mol. Biol.* 314, 1137–1147.

[16] Thomassen, E., Gielen, G., Schütz, M., Schoehn, G., Abrahams, J. P., Miller, S., and van Raaij, M. J. (2003) The structure of the receptor-binding domain of the bacteriophage T4 short tail fibre reveals a knitted trimeric metal-binding fold. *J. Mol. Biol.* 331, 361–373.

[17] Seckler, R. (1998) Folding and function of repetitive structure in the homotrimeric phage P22 tailspike protein. *J. Struct. Biol.* 122, 216–222.

[18] Betts, S. and King, J. (1999) There's a right way and a wrong way: in vivo and in vitro folding, misfolding and subunit assembly of the P22 tailspike. *Struct. Fold. Des.* 7, R131–R139.

[19] Mitraki, A. and King, J. (1989) Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Bio/Technology* 7, 690–697.

[20] Lee, P. W. K., and Gilmore, R. (1998) Reovirus cell attachment protein sigma1: structure-function relationships and biogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 233, 137–153.

[21] Gilmore, R., Coffey, M. C., and Lee, P. W. K. (1998) Active participation of Hsp90 in the biogenesis of the trimeric reovirus cell attachment protein sigma1. *J. Biol. Chem.* 273, 15,227–15,233.

[22] Burda, M. R. and Miller, S. (1999) Folding of coliphage T4 short tail fiber in vitro: analysing the role of a bacteriophage-encoded chaperone. *Eur. J. Biochem.* 265, 771–778.

[23] Horwitz, M. S. (1996) Adenoviruses, in *Fields Virology*. (Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., eds.), Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 2149–2171.

[24] Green, N. M., Wrigley, N. G., Russel, W. C., Martin, S. R., and McLachlan, A. D. (1983) Evidence for a repeating cross-beta sheet structure in the adenovirus fiber. *EMBO J.* 2, 1357–1365.

[25] Xia, D., Henry, L.J., Gerard, R.D., and Deisenhofer J. (1994) Crystal structure of the receptor-binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1. 5 Å resolu- tion. *Structure* 2, 1259–1270.

[26] van Raaij, M. J., Louis, N., Chroboczek, C., and Cusack, S. (1999) Structure of the human adenovirus serotype 2 fiber head domain at 1. 5 A resolution. *Virology* 262, 333–343.

[27] Bewley, M. C., Springer, K., Zhang, Y. B., Freimuth, P., and Flanagan, J. M. (1999) Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science* 286, 1579–1583.

[28] Durmort, C., Stehlin, C., Schoehn, G., Mitraki, A., Drouet, E., Cusack, S., and Burmeister, W. P. (2001) Structure of the fiber head of Ad3, a non-CAR-binding serotype of adenovirus. *Virology* 285, 302–312.

[29] Lortat-Jacob, H., Chouin, E., Cusack, S., and van Raaij, M. J. (2001) Kinetic analysis of adenovirus fiber binding to its receptor reveals an avidity mechanism for trimeric receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 276, 9009–9015.

[30] Chappell, J. D., Prota, A. E., Dermody, T. S., and Stehle, T. (2002) Crystal structure of reovirus attachment protein sigma1 reveals evolutionary relationship to adenovirus fiber. EMBO J. 21, 1–11.

[31] Karam, J. D. (1994) Molecular Biology of Bacteriophage T4, ASM Press, Washington, DC.

[32] Crowther, R. A., Lenk, E. V., Kikuchi, Y., and King, J. (1977) Molecular reorganization in the hexagon to star transition of the baseplate of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 116, 489–523.

[33] Kanamaru, S., Leiman, P. G., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., Mesyan-zhinov, V. V., Arisaka, F., and Rossmann, M. G. (2002) Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. *Nature* 415, 553–557.

[34] Cerritelli, M. E., Wall, J. S., Simon, M. N., Conway, J. F., and Steven A. C. (1996) Stoichiometry and domainal organization of the long tail-fiber of bacteriophage T4: a hinged viral adhesin. *J. Mol. Biol.* 260, 767–780.

[35] Zhang, S., Holmes, T., Lockshin, C., and Rich, A. (1993) Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3334–3338.

[36] Aggeli, A., Bell, M., Boden, N., Keen, J. N., Knowles, P. F., McLeish, T. C., Pitkeathly, M., and Radford, S. E. (1997) Responsive gels formed by the spontaneous self-assembly of peptides into polymeric beta-sheet tapes. *Nature* 386, 259–262.

[37] Aggeli, A., Nyrkova, I. A., Bell, M., Harding, R., Carrick, L., McLeish, T. C., Semenov, A. N., and Boden, N. (2001) Hierarchical self-assembly of chiral rod-like molecules as a model for peptide beta-sheet tapes, ribbons, fibrils, and fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11,857–11,862.

[38] Zhang, S. and Altman, M. (1999) Peptide self-assembly in functional polymer science and engineering. *React. Funct. Polym.* 41, 91–102.

[39] Zhang, S., Marini, D. M., Hwang, W., and Santoso, S. (2002) Design of nanostructured biological materials through self-assembly of peptides and pro- teins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 865–871.

[40] Luckey, M., Hernandez, J., Arlaud, G., Forsyth, V. T., Ruigrok, R. W., and Mitraki, A. (2000) A peptide from the adenovirus fiber shaft forms amyloid-type fibrils. *FEBS Lett.* 468, 23–27.

[41] Mitraki, A., van Raaij, M. J., Ruigrok, R., Cusack, S., Hernandez, J.-F., and Luckey, M. (2001) Structure, folding and assembly of adenovirus fibers, in *Self-Assembling Peptide Systems in Biology, Medicine and Engineering* (Aggeli, A., Boden, N., and Zhang, S., eds.), Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, pp. 221–233.

[42] Novelli, A. and Boulanger, P. A. (1991) Deletion analysis of functional domains in baculovirus-expressed adenovirus type 2 fiber. *Virology* 185, 365–376.

[43] Hong, J. S. and Engler, J. A. (1996) Domains required for assembly of adenovirus type 2 fiber trimers. *J. Virol.* 70, 7071–7078.

[44] McLaughlin, S. H. and Bulleid, N. J. (1998) Molecular recognition in procollagen chain assembly. *Matrix Biol.* 16, 369–377.

[45] Tao, Y., Strelkov, S. V., Mesyanzhinov, V. V., and Rossmann, M. G. (1997) Structure of bacteriophage T4 fibritin: a segmented coiled coil and the role of the C-terminal domain. *Structure* 5, 789–798.

[46] Hartgerink, J.D., Beniash, E., and Stupp, S.I. (2001) Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 294, 1684– 1688.

[47] Barnett, B. G., Crews, C. J., and Douglas, J. T. (2002) Targeted adenoviral vectors. *Biochim. Biophys. Acta* 1575, 1–14.

[48] Seki, T., Dmitriev, I., Kashentseva, E., Takayama, K., Rots, M., Suzuki, K., and Curiel, D. T. (2002) Artificial extension of the adenovirus fiber shaft inhibits infectivity in coxsackievirus and adenovirus receptor-positive cell lines. *J. Virol.* 76, 1100–1108.

[49] O'Brien, J. P., Hoess, R. H., Gardner, K. H., Lock, R. L., Wasserman, Z. R., Weber, P. C., and Salemme, F. R. (1994) Design, synthesis, and fabrication of a novel self-assembling fibrillar protein, in *Silk Polymers, Materials Science and Biotechnology*, ACS Symposium Series 544 (Kaplan, D., Adams, W. W., Farmer, B., and Viney, C., eds.), American Chemical Society, Washington, DC, pp. 104–117.

[50] Gillespie, D. B., Thiel, B. L., Trabbic, K. A., Viney, C., and Yager, P. (1994) Structural investigation of $(AdII)_{26}$ fiber, a novel bioengineered material based on a viral spike protein. *Macromolecules* 27, 6177–6182.

[51] Hyman, P., Valluzzi, R., and Goldberg, E. (2002) Design of protein struts for self-assembling nanoconstructs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 8488–8493.

[52] Miroshnikov, K. A., Marusich, E. I., Cerritelli, M. E., Cheng, N., Hyde, C. C., Steven, A. C., and Mesyanzhinov, V. V. (1998) Engineering trimeric fibrous proteins based on bacteriophage T4 adhesins. *Protein Eng.* 11, 329–332.

[53] Frank S., Kammerer, R. A., Mechling D., Schulthess, T., Landwehr, R., Bann, J., Guo, Y., Lustig, A., Bächinger, H. P., and Engel, J. (2001) Stabilization of short collagen-like triple helices by protein engineering. *J. Mol. Biol.* 308, 1081–1089.

[54] Stetefeld, J., Frank, S., Jenny, M., Schulthess, T., Kammerer, R. A., Boudko, S., Landwehr, R., Okuyama, K., and Engel, J. (2003) Collagen stabilization at atomic level: crystal structure of designed (GlyProPro)(10) foldon. *Structure* 11, 339–346.

[55] Krasnykh, V., Belousova, N., Korokhov, N., Mikheeva, G., and Curiel, D. T. (2001) Genetic targeting of an adenovirus vector via replacement of the fiber protein with the phage T4 fibritin. *J. Virol.* 75, 4176–4183.

[56] Kraulis, P. J. (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 24, 946–950.

第7章 用鲁棒纳米传感器识别检测的核磁共振方法的应用

Monique Cosman, Viswanathan V, Krishnan, Rod Balhorn

概　　述

核磁共振（NMR）光谱学是研究原子级生物分子相互作用的一种强大技术。我们的核磁共振实验室涉及小分子或配体的鉴定，即配体与靶蛋白受体如破伤风神经毒素（TeNT）和肉毒神经毒素，炭疽蛋白和非霍奇金淋巴瘤的癌细胞上人类白细胞相关抗原DR10（HLA-DR10）受体结合。低亲和力结合剂一旦被识别，它们可与产生多重合成的高亲和力配体（SHAL）连接在一起，它们的靶蛋白受体具有非常高的特异性。合成的高亲和力配体重要纳米技术的应用是开发鲁棒化学传感器，或开发测定环境样品中或体液中病原体蛋白质的生物芯片。在这里，我们介绍最近开发的基于转移核欧沃豪斯效应光谱核磁共振竞争分析，转移核欧沃豪斯效应光谱能识别，与破伤风毒素片段C（TetC）表面上同一位点或不同的位点结合的配体集，而不是称为“标记”配体阿霉素。使用这种分析，可以识别为创建检测剂连接在一起的最优配体对，以及评估配体竞争相同位点的相对结合常数。

关键词：核磁共振；基于结构的药物设计；转移核欧沃豪斯效应光谱；破伤风毒素；生物传感器

7.1　导　　论

核磁共振（NMR）光谱已演变成支持基于结构药物设计的重要技术，因为在分子互作研究方面有悠久的传统[1,2]。用于普通的结合分析的几个核磁共振实验识别力较弱，但小分子和靶蛋白之间的结合专一。这些核磁共振筛选方法的优点是，它们可以立即用于目标蛋白而不需要大量的预试验。其他科学家对核磁共振筛选方法已有大量综述[3~5]，除核欧沃豪斯效应转移谱（trNOESY）的实验外，这里不再细说。

核欧沃豪斯效应转移谱实验[6~8]通常在快速交换的条件下，用于检测配体与靶蛋白的结合（即与微摩尔到毫摩尔结合配体的解离常数）。核欧沃豪斯效应转移谱方法的优点是，它不需要大量纯净的、标记的蛋白质；它不受蛋白质大小的限制；它可以提供关于配体结合形式的结构信息。实验中，每个配体内核欧沃豪斯效应（NOE）交叉峰，由群体量核交叉弛豫速率控制[9]（图 7.1）。因此，该项目是相对简单的检测，并不需要耗时的化学分配手段。观察结合物强负性核欧沃豪斯效应交叉峰，与缺乏靶受体的相同化合

物中弱阳性或无核欧沃豪斯效应交叉峰相反，如图 7.2 中显示的 MP-生物胞素。于是，游离对键合状态之间核欧沃豪斯效应交叉峰的符号触发就像一个简单的区分键合与非键合的二进制过滤器[10,11]（见 7.4 节注意事项 1）。

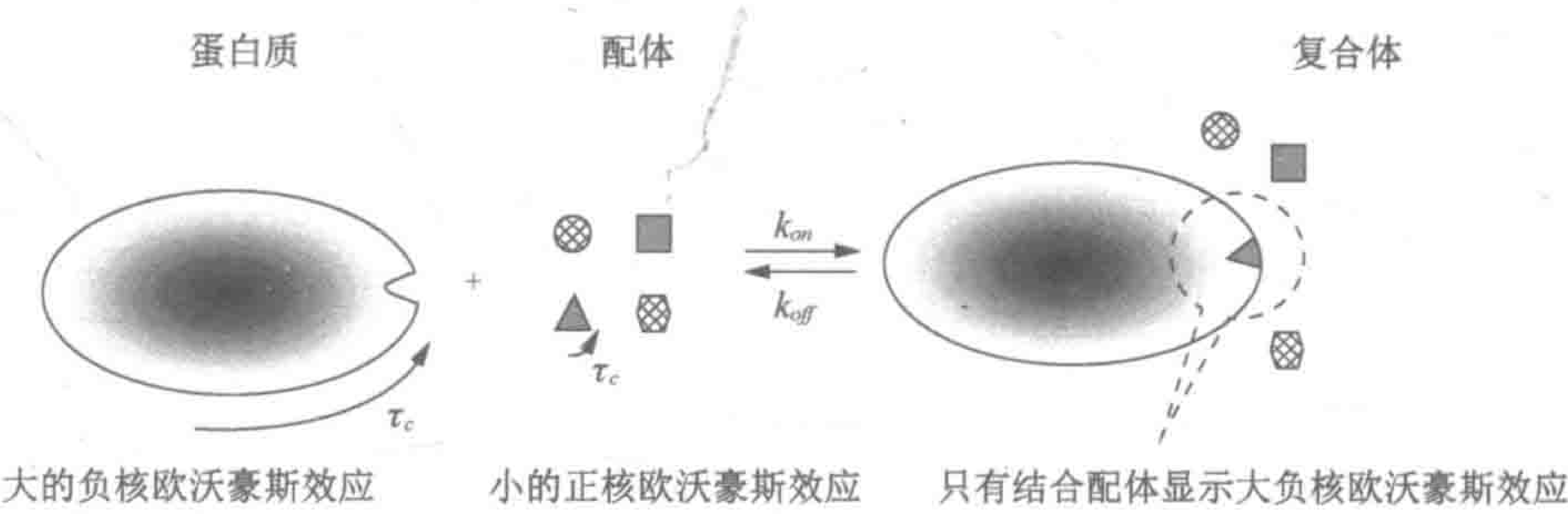


图 7.1　核欧沃豪斯效应转移谱（trNOESY）实验原理图。只有配体结合时核欧沃豪斯效应起作用，因为仅在结合状态时配体经历较长的相关时间（τ_c）。在游离状态下配体共振时传送和测定核欧沃豪斯效应

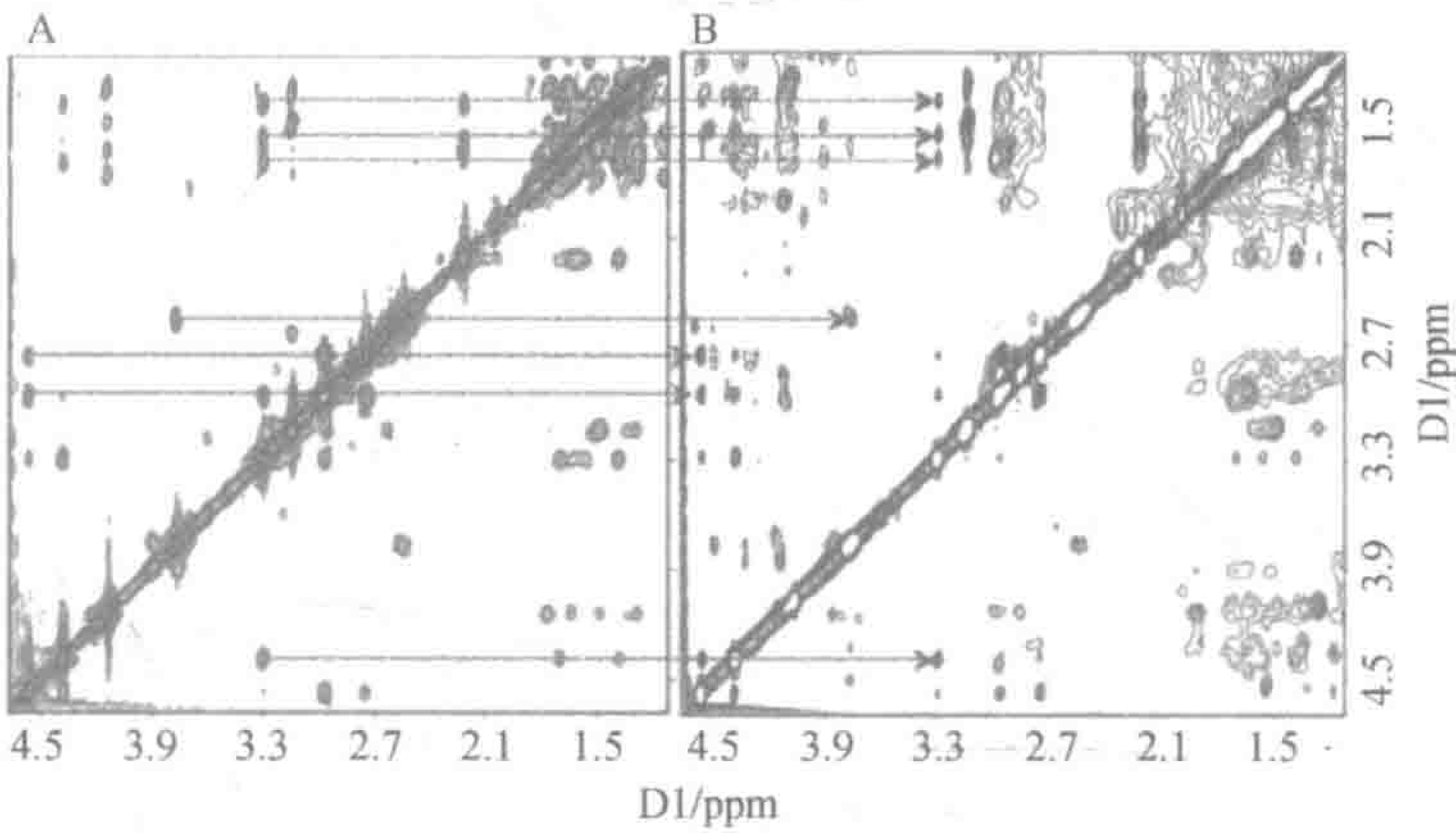


图 7.2　核欧沃豪斯效应转移谱实验：（A）MP-生物胞素 A 900ms 核欧沃豪斯效应转移谱（约 1mmol/L）表现出弱阳性交叉峰（灰色）。（B）中添加四环素耐药基因 *TetC*（约 0.05mmol/L）的结果，在 300ms 核欧沃豪斯效应触发信号为负数（黑色）并增加了强度的 MP-生物胞素交叉峰，表明 MP-生物胞素与四环素耐药基因结合。为了演示目的，两个光谱的几个交叉峰都由虚线箭头和（A）中的 900ms 谱比 300ms trNOESY 光谱低于 2 倍水平（B）。该光谱是在 30℃条件下获得的

用于传感器选择试剂的一个重要参数是相对结合亲和力。最近，几个实验室，包括我们自己的实验室，已开始考量核磁共振筛选方法是否可以同时和快速地提供这些信息[12~14]。由两个或更多个配体通过弱结合的多价配体制备，对于每个配体，是否与另外的配体以相同位点或不同位点转移性结合的测定，也是非常有益的。尽管由二价化合物连接的个别配体，可能只与蛋白质弱结合，如预期的一样，由于连接化合物的结合自由能小，原理上是每个片段加上自身的自由能总和[15]。因此，具有小于微摩尔解离常数连接的化合物，可以通过连接两个片段，每个比微摩尔范围[16]更大的解离来获得。在这里，我们提出开展破伤风毒素片段 C（TetC）转移核欧沃豪斯效应竞争结合法的详细方法。

破伤风毒素和肉毒杆菌毒素（BoNT）是梭菌神经毒素家族中结构和功能的相关成员。

最近对这些神经毒素的兴趣源于医学，破伤风毒素和肉毒杆菌毒素使用频率增加，偶尔由于毒素摄入造成奶牛和野禽死亡，以及这种蛋白质可能被恐怖组织或其他国家作为一种生物武器使用的潜在威胁[17,18]。两种毒素选择性地集中在脊椎动物运动神经元轴突的突触，是已知人类最有效的毒素[19]。这些毒素进入神经细胞需要与细胞表面上的神经节苷脂进行初始结合。因此，阻断神经细胞结合的有效抑制剂，可开发解毒剂或作为检测和识别这些高毒性蛋白质的亲和力为基础的化学传感器的分子识别材料。

7.2 材　料

1）高场核磁共振仪（≥500MHz）（见 7.4 节注意事项 2）。

2）应用化学品目录（ACD）或类似化合物数据库中筛选。

3）重组破伤风毒素片段 C（TetC）（罗氏公司，印第安纳波利斯，印第安纳州，美国）。

4）100%的氧化氘（D_2O）（Isotech 公司，迈阿密斯堡，俄亥俄州，美国）。

5）100%氘代二甲基亚砜（DMSO）（Isotech 公司）。

6）阿霉素盐酸盐（Sigma-Aldrich 公司，圣路易斯，密苏里州，美国）。**警告：**抗肿瘤药物阿霉素是逆转录酶和 RNA 的抑制剂的聚合酶，是一种免疫抑制剂，并能嵌入到 DNA 中[20~22]。

7）3′-唾液乳糖（Sigma-Aldrich 公司）。

8）肌氨酸-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸-脯氨酸（Sar-RGDSP）（Sigma-Aldrich 公司）。

9）3-(*N*-马来酰亚胺基丙酰基)生物胞素（MP-生物胞素）（Sigma-Aldrich 公司）。

10）薰草菌素 A（Sigma-Aldrich 公司）。**警告：**薰草菌素 A 是蛋白酪氨酸激酶抑制剂[23]。

11）萘基荧光素二-β-D-吡喃半乳糖苷（NF-GalPyr）（Sigma-Aldrich 公司）。

12）丝氨酸-谷氨酰胺-天冬酰胺-酪氨酸-脯氨酸-异亮氨酸-缬氨酸（SQNYPIV）（Calbiochem-Novabiochem 公司，La Jolla，加利福尼亚州，美国）。

13）唾液酸（Calbiochem-Novabiochem 公司）。

7.3 方　法

7.3.1 核欧沃豪斯效应转移谱实验理论

在 500～600MHz（H_v）分光光度频率，小分子（相对分子质量<1500）在游离状态下产生小的、正核欧沃豪斯效应，而大分子蛋白质（相对分子质量>10 000），产生大的负核欧沃豪斯效应。在快速交换机制（结合常数在 10^{-3}mol/L 和 10^{-7}mol/L 之间）中，反

向结合时，配体获得大分子核欧沃豪斯效应特征并显示大的负核欧沃豪斯效应（图 7.1）。这些特征是从配体的键合状态转移到游离状态，所以，由于游离配体快速的总旋转相关时间 τ_c 的原因，配体的信号仍然很强烈。通过两者信号的变化和细胞分子内核欧沃豪斯效应的强度积累率，如此识别配体结合情形。

多年来，转移核欧沃豪斯效应结合机制理论得到了很好的发展[24~29]。核欧沃豪斯效应动力学受 3 种平衡过程控制：



$$[P]+[L]\underset{k_{\text{off}}}{\overset{k_{\text{on}}}{\rightleftharpoons}}[PL] \tag{7.1}$$

式中，$[P]$、$[L]$和$[PL]$分别是蛋白质、配体及复合物的摩尔浓度；k_{on} 和 k_{off} 分别是结合常数和解离常数。在核欧沃豪斯转移效应实验中，游离和结合状态之间的配体交换，改变配体的弛豫动力学比蛋白质更显著。平衡条件下，结合常数 K_D 是 k_{off} 与 k_{on} 的比值。有关核磁共振交换率 k_{ex}，依赖于蛋白质和配体相对群体及结合常数并定义为

$$k_{\text{ex}}=k_{\text{on}}[P]+k_{\text{off}}=k_{\text{off}}/(1-L_b) \tag{7.2}$$

其中 L_b 是结合配体分数。单独配体结合位点 L_b 等于：

$$L_b=\left\{(P_T+L_T+K_D)-\left[\sqrt{(P_T+L_T+K_D)^2}-4P_TL_T\right]\right\}/2L_T \tag{7.3}$$

式中，P_T 和 L_T 分别是总蛋白质和配体的浓度，K_D 是结合常数。在执行核欧沃豪斯效应转移实验时，对至少有半饱和的蛋白质结合位点（$L_T\approx K_D$）非常有用。这是通过使用大摩尔过量的 5～50 倍蛋白质配体来实现的。蛋白质结合形式和配体游离形式之间的磁化交换产生一个平均的核欧沃豪斯效应转移。

平均交换核欧沃豪斯效应转移依赖于交换速度和游离（NOE_f）和结合（NOE_b）形式之间的核欧沃豪斯效应转移（NOE）的幅度。如果 $k_{ex}\gg[\text{NOE}_f-\text{NOE}_b]$、$k_{ex}\approx[\text{NOE}_f-\text{NOE}_b]$、$k_{ex}\ll[\text{NOE}_f-\text{NOE}_b]$，交换速率 k_{ex} 被分为快、中或慢三项。在快速交换（$k_{ex}\gg[\text{NOE}_f-\text{NOE}_b]$）中，trNOE 实验非常有用，因为观察到 NOE 然后是群体量的平均数。

配体内分子 NOE 与蛋白质分子间交换 NOE 之间的动态相互作用，可以通过组合 Solomon 的方程和化学交换方程[30~32]加以说明。使用这种方案，Clore 和 Gronenborn[25,26]通过矩阵符号说明观察到的 trNOE 结果。组合的矩阵包括在多自旋系统中成对相互作用，同时考虑自旋扩散效果[29,33,34]。二维（2D）trNOE 实验发展强度（trNOESY）由式（7.4）表示[30,32]：

$$\frac{d}{d\tau_m}V(\tau_m)=-\Gamma V(\tau_m) \tag{7.4}$$

式中，τ_m 是混合时间，矩阵 V 的元件（τ_m）是在 trNOESY 频谱中交叉峰峰体积，即用弛豫交换矩阵 Γ 来描述。交换速率（k_{ex}）及自身速率（ρ_{ij}）和各种质子对交叉弛豫率（σ_{ij}）等被包含在 Γ 中。当交换是相对于弛豫率快时，有效速率常数就是游离和结合形式的速率常数摩尔分数加权的平均值。因此，如果 i 和 j 是配体自转，有效交叉弛豫率 σ_{ij}^{avg} 是

$$\sigma_{ij}^{\text{avg}} = L_b \sigma_{ij}^{\ b} + (1 - L_b)\sigma_{ij}^{\ f} \tag{7.5}$$

在这个快速交换机制中，正如 Landy 和 Rao[35]所指出的那样，弛豫＋交换矩阵，Γ，可以均衡，因此，为 *m*-自旋配体和 *n*-自旋蛋白速率方程可简化为（*n*+*m*）差分方程[36]。配体和蛋白质相对浓度，根据 Zabell 和 Post[37]的理论，式（7.2）可以写成：

$$\frac{d}{d\tau_m}\begin{bmatrix}(V^b{}_l + V^f{}_l)\sqrt{\mu^b_p} \\ (V^b{}_p + V^f{}_p)\sqrt{\mu^b{}_l}\end{bmatrix} = -\begin{pmatrix}\mu^b{}_l\Gamma^b{}_l + \mu^f{}_l\Gamma^f{}_l & \sqrt{(\mu^b{}_l\mu^b{}_p)}\Gamma^b{}_{lp} \\ \sqrt{(\mu^b{}_l\mu^b{}_p)}\Gamma^b{}_{lp} & \mu^b{}_p\Gamma^b{}_p + \mu^f{}_p\Gamma^f{}_p\end{pmatrix}\times \begin{bmatrix}(V^b{}_l + V^f{}_l)\sqrt{\mu^b{}_p} \\ (V^b{}_p + V^f{}_p)\sqrt{\mu^b{}_l}\end{bmatrix} \tag{7.6}$$

式中，Γ_l^b 和 Γ_l^f 代表对称的 $n\times n$ 个分别为结合和游离形式配体的弛豫矩阵；$\Gamma_p^{\ b}$ 和 Γ_p^f 具有蛋白质相似定义。相对浓度，以“μ”的定义如下：

$$\begin{aligned}\mu^b{}_l &= [\text{PL}]/([\text{PL}]+[\text{L}]) \\ \mu^f{}_l &= [\text{L}]/([\text{PL}]+[\text{L}]) \\ \mu^b{}_p &= [\text{PL}]/([\text{PL}]+[\text{P}]) \\ \mu^f{}_p &= [\text{P}]/([\text{PL}]+[\text{P}])\end{aligned} \tag{7.7}$$

这些公式通常在 trNOESY 光谱配体交叉峰需要确定配体结合形式结构的定量情况下使用。这些信息对于优化的蛋白质/配体复合物结合计算方案优化模型特别有用，反过来，用于在蛋白质靶位上开发具有更高的亲和力和特异性新的配体。

7.3.2　核磁共振实验装置

7.3.2.1　NMR 脉冲序列

NMR 的脉冲序列，是由一系列穿插着延迟射频脉冲组成，是实际的核磁共振实验。trNOESY 实验脉冲与传统的三脉冲 NOESY 实验序列稍有不同[38]，如图 7.3 所示。

1．蛋白信号滤波（见 7.4 节注意事项 3）

普通的修饰是插入弛豫滤波器来抑制外来蛋白质的信号，其中可能干扰配位体信号的检测。这可以通过 $T_{1\rho}$（或 R_2）滤波器来实现。这样，滤波器可以在之前或在第一次 90° 脉冲之后引入。如果先于第一个脉冲引入，滤波器需要通过额外的 90° 脉冲或无窗口的多个脉冲序列，如需要使用 DIPSI[39]，以便滤波器使用之后沿 *Z* 轴进行磁化作用。如果滤波器在第一个 90° 脉冲后介入，如 Scherf 和 Anglister[40]在原始实验中提出的那样，必须小心获取第一 t_1 点以避免间接度量需要大的相位校正。

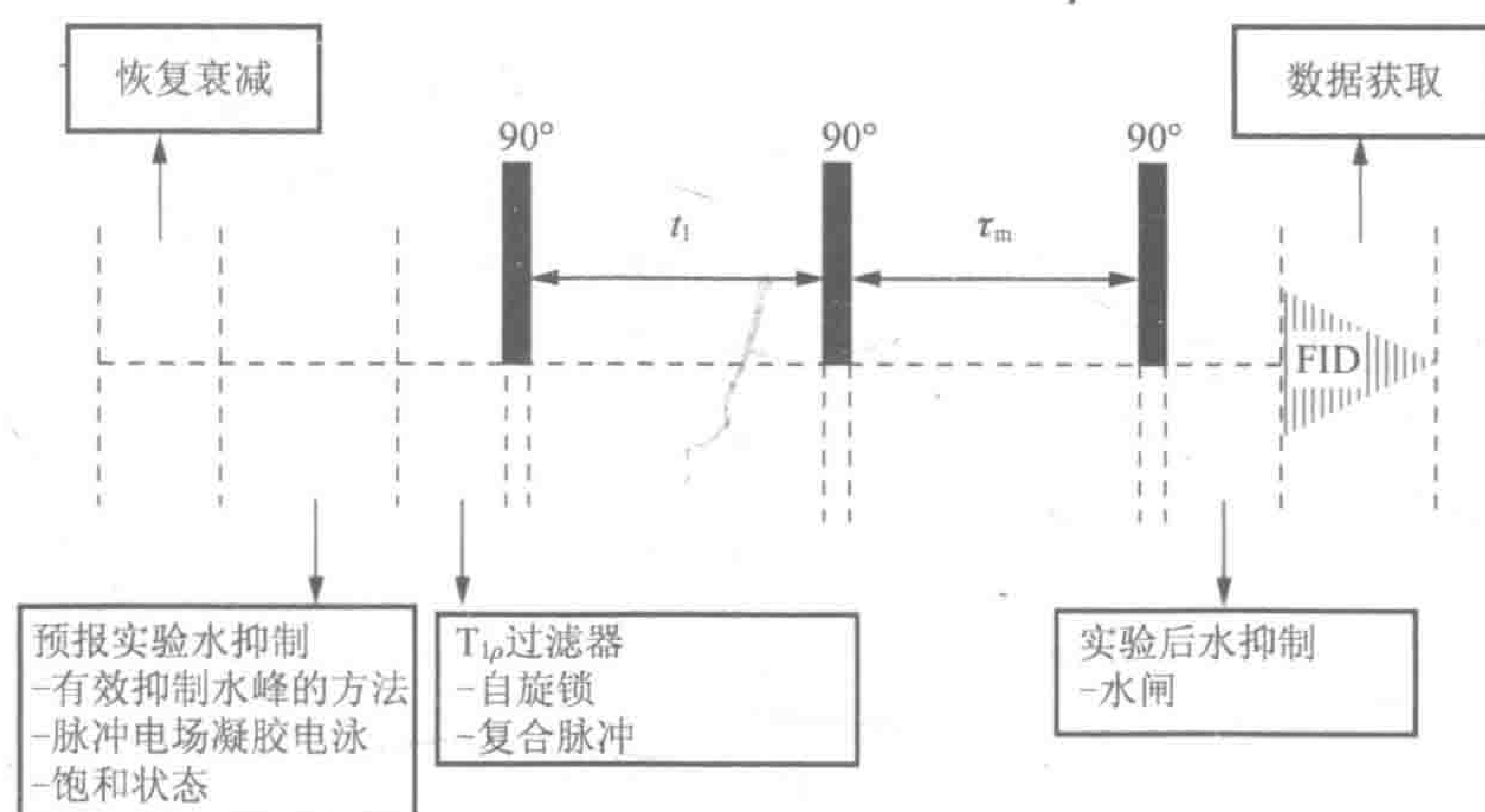


图 7.3 trNOESY 脉冲序列。黑色柱代表 90° 射频脉冲和 FID 代表自由感应衰减。脉冲与接收器是选择 NOE 并沿 t_1 进行相位敏感检测的相循环。湿、水抑制，通过 T_1 效应增强湿度和水的抑制度；脉冲电场凝胶电泳（DPFGE），双脉冲电场梯度回波

2．水信号的抑制（见 7.4 节注意事项 4）

另一种常见的脉冲序列修饰是对照或水磁化的抑制。各种预实验水抑制效应方案是可用的，诸如基于造型抑制激励[41]或 WET（water suppression enhanced through T_1 effects，有效抑制水峰的方法）脉冲序列[42,43]。使用诸如 Watergate（water suppression pulse sequence，水峰压制脉冲序列）脉冲序列或它的修饰方法，实验后水信号消除也是一个可行的替代方法[44,45]。当在 trNOESY 实验中考虑水抑制方案时，关键要考虑水抑制将如何影响检测配位体的信号。例如，如果配体含有交换质子，那么避免预饱和是可取的，因为它也趋向于饱和这些共振。同样重要的是，要注意所有的实验后水抑制方案（如 Watergate）具有接近水频率不均匀的激励轮廓。在这种情况下，可取的方法是调节样品温度来移去水信号，使得附近的任何配体共振不会受到抑制。

7.3.2.2 选择混合时间

筛选目的首先要有益于识别，没有蛋白质时配体的质子共振。这要求得到配体的 NOESY 谱。直接比较单个配体光谱与配体光谱或存在于破伤风毒素片段 C 中的混合配体的光谱，提供简单且快速的鉴定那些交叉峰的方法，这些交叉峰属于没有特定配体必须分配给化学位移。化学位移分配常常是一个非常费时的过程，而且需要确定配体结合形式的结构。

缺乏蛋白质时进行 NOESY 实验，需要较长（600～900ms）的混合时间，而在破伤风毒素片段 C（TetC）存在下配体混合物进行转移核欧沃豪斯效应（NOESY）实验则需要更短（200～300ms）的混合时间。小分子（分子质量＜1～2kDa）的核欧沃豪斯效应测定需要较长混合时间，因为 ω_0（2π×光谱频率）和 τ_c（旋转相关时间）的产物＜1（$\omega_0\tau_c<1$）。与此相反，大分子或与大分子结合配体测定则需要较短的混合时间，因为 $\omega_0\tau_c\gg1$ [46]。

7.3.2.3 实验时间

通常情况下，收集 t_1 中的 300 增量，每次 48 或 64 次扫描，并收集到 t_2 中的 1024 复合数据点。使用程序 VNMR（版本 6.1C；瓦里安公司，帕洛阿尔托，加利福尼亚州，美国）处理我们的核磁共振数据，并使用 FELIX 程序（版本 97；Accelrys 公司，圣地亚哥，加利福尼亚州，美国）进行分析。

完成核欧沃豪斯效应转移谱（trNOESY）或核欧沃豪斯效应（NOESY）实验的时间依赖于配体的浓度和混合时间。例如，两个单独的配体（900ms 的混合时间，48 次扫描）和在 TetC 的存在下配体（300ms 的混合时间，64 次扫描）以大约 0.3mmol/L 的浓度，需要 20h。以 1mmol/L 的配体浓度，所需要的时间可以减少一半。收集混合物配体数据而不是单一配体数据可进一步减小 trNOESY 实验所需总时间。

7.3.2.4 温度的影响

在我们的研究中，我们任意选择在 20℃或 30℃进行 trNOESY 实验，根据经验发现，该数据在较高温度下对大多数配体略有改善。改变温度可以改变配体与 TetC 之间交换的速度，从而在没有观察到结合的某些情况下，增加检测 trNOE 的可行性。低温减缓交换速率，而较高温度提高交换速率。因此，解决 trNOESY 竞争分析的重要限制因素的方法之一——即只对那些具有毫摩尔至微摩尔解离常数化合物结合的测定，因此才能改变温度和交换速率（见 7.4 节注意事项 5）。

7.3.3 样品的制备

7.3.3.1 配体筛选 TetC 结合最佳设置的鉴定

有几种策略包括随机筛选合适的化学数据库，可用来识别潜在结合剂。在本项研究中，TetC 两种晶体结构（PDB 接入码 1AF9 和 1A8D[47,48]，http://www.rcsb.org/pdb/）都适用，所以我们采用了一种基于结构的方法。

1．确定合适配体的计算方法

使用蛋白质晶体结构的第一步是确结合位点，并进行 ACD 的实际扫描。通过计算易感溶剂表面，并使用球形结构进入口袋结构的聚类包 DOCK4.01[49]的 SPHGEN 程序计算识别两个表面的结合位点，位点 1 和位点 2。在 DOCK4.01 程序中球体原子匹配方案[50~52]，然后用 ACD 计算扫描，目前已测定超过 300 000 种市售化合物，并预测哪些分子可能与位点 1 和站点 2 结合。各种多样性结构配体被选择为候选光谱材料，根据能量和接触分数对最好的候选材料进行了归类排名。然后将 100 个顶尖化合物用外表定性检查评估它们与位点形成的相互作用。

2．配体设置优化和进一步缩小范围

基于成本和可用性选择标准，下一步将进一步缩小 100 个化合物的范围，每个位点最终选出 10～20 个化合物。经电喷雾离子化质谱分光光度计（ESI-MS），检查剩余化合

物的结合活性而最终切除[53,54]（表 7.1）。虽然这一步不是必须的，但它确实显著加快缩小候选化合物数量的进程。300 000 配体的排序为每个位点在列表中产生了十几个优化化合物（图 7.4），用于我们的核磁共振对水性环境中的结合活性筛选研究。检查溶液中结合活性有几个重要理由。尤其是，试剂在水环境中的应用是检测的先决条件。此外，在类似溶剂条件下，新颖二价配体的合成需要单个化合物与另一种化合物和与 TetC 彼此相匹配。

表 7.1　与 TetC 形成的非共价复合物电喷雾电离质谱阳性配体试验

预期位点 1	预期位点 2
阿霉素[a,b]	酪氨酸-谷氨酸-色氨酸
3′-唾液乳糖[2]	薰草菌素 A
D-(+)-纤维四糖[a]	肌氨酸-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸-脯氨酸
新橙皮苷 diHCl[a]	萘基荧光素二β-D-吡喃半乳糖苷
甘氨酸-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸	马来酰亚胺丙酰基生物胞素
血啡肽-5[a]	丝氨酸-谷氨酰胺-天冬酰胺-酪氨酸-脯氨酸-异亮氨酸-缬氨酸
磷酸依托泊甙	

a. 参考文献[57]报道；b. 肉毒毒素/肉毒毒素 B 中的结合位点 1[55]

7.3.3.2　储备液和样品液的制备

1）在−25～−15℃存放干燥重组 TetC（见 7.4 节注意事项 6）。

2）将干燥（冻干）的 1～3mg TetC 蛋白质样品溶解在 500μl/100% D_2O，获得最终浓度为 38～72μmol/L 的实验（见 7.4 节注意事项 7）。

3）在加入配体之前，以最高离心速度离心 5min 除去任何不溶性物质。

4）用 100μl D_2O 或氘化二甲基亚砜（DMSO）制备配体浓缩储备液。目的是保持二甲基亚砜中的总浓度在 5%或低于 5%（*V*/*V*）。预计加入少量的二甲基亚砜不会影响蛋白质的稳定性，如以前由核磁共振研究证明的一样[16]，但应通过了解蛋白质在 5%的 DMSO 溶液中的结合剂，从而实验检测每一种蛋白质是否仍然有可检测的结合活性。将三配位体、MP-生物胞素、薰草菌素 A 和 NF-硫代半乳糖吡喃糖苷，溶解在氘化的 DMSO 中，其余的配体（图 7.4）均溶于 D_2O 中。

5）配体储备液体积的计算，需要制备 0.3～1mmol/L 浓度，最终样品体积为 500～600μl。测试 TetC：阿霉素的不同摩尔比范围为（1∶5）～（1∶50），以便确定用于实验的最佳比例（见 7.4 节注意事项 8）。

6）通过以下两种方法之一制备蛋白质-配体复合物。

a. 将 3mg TetC 溶解于 1.0ml D_2O（57.9μmol/L）中，在加入配体之前，用 Eppendorf 微量离心机以最高速度离心 5min 除去不溶物。

b. 制备配体混合物 500～800μl D_2O（为 0.2～1μmol/L），然后加入无水 TetC（38～72μmol/L）的 1～3mg 至 TetC：配体最终比例大约为 1∶20。

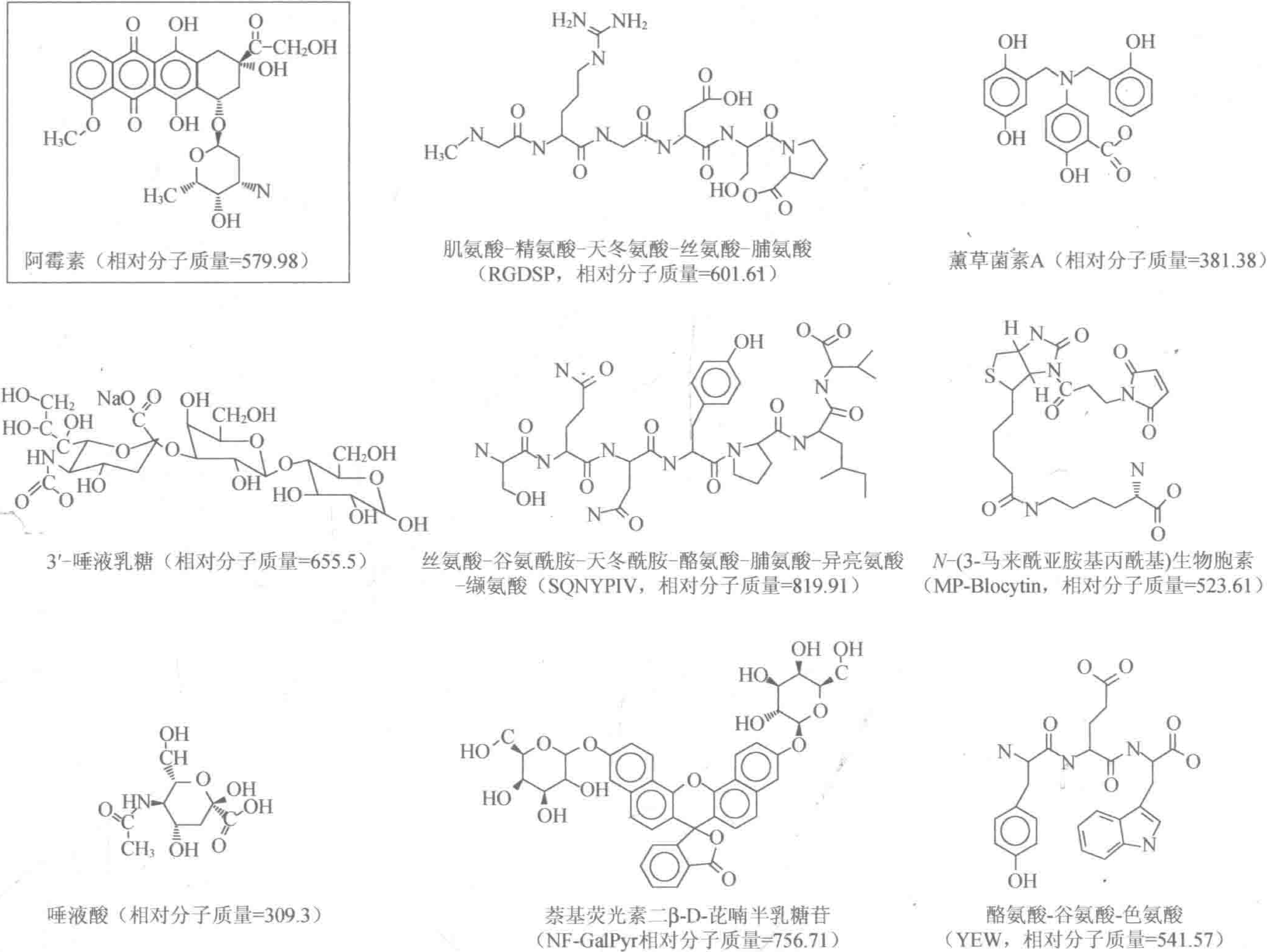


图 7.4　本研究中使用的配体结构和相对分子质量。以方框标记配体阿霉素

7.3.4　筛选/核欧沃豪斯效应转移谱竞争分析

核欧沃豪斯效应转移谱（trNOESY）竞争分析需要“标记”配体，即要了解蛋白质上的结合位点和优选结合常数。肉毒毒素或肉毒毒素 B（BoNT/B）配体复合物晶体结构研究显示，阿霉素[55]和 3′-唾液乳糖[56]与位点 1 结合（图 7.5）。发现位点 1 是以 TetC 和 BoNT 两种结构存在，从与阿霉素复合物中的 TetC 晶体结构获得的初步结果表明，阿霉素也结合到 TetC 位点 1 上（S. Swaminathan，个人通信，2002 年 3 月）。另外，阿霉素解离常数/TetC 络合物是已知的，大约 10μmol/L [57]。阿霉素是用于本研究的理想标记配体。

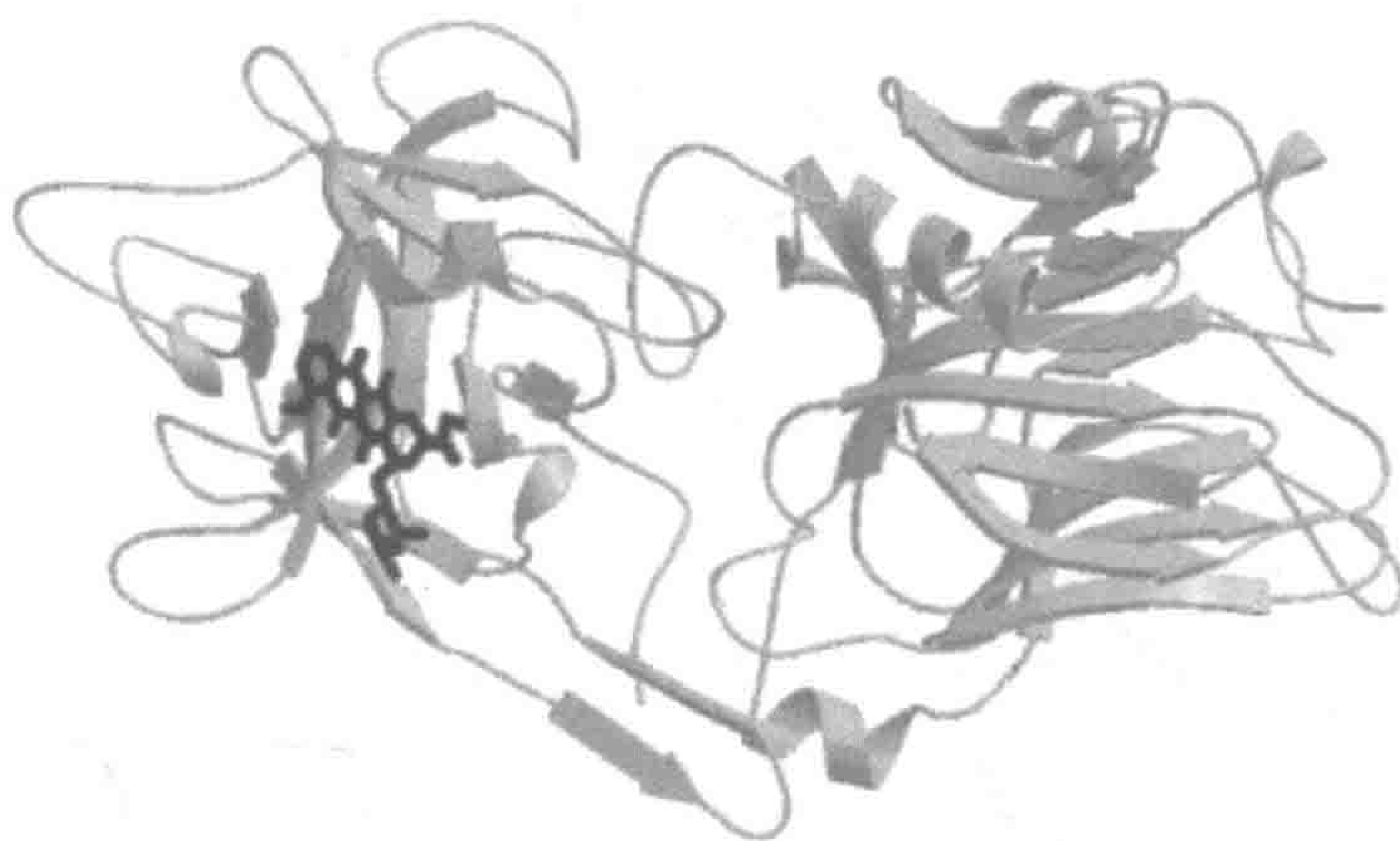


图 7.5　TetC 与阿霉素的晶体结构，标记配体停靠在位点 1。该图使用 Molscript[60]和 Raster3D[61]的程序绘制

通过确定阿霉素竞争实验是否与 TetC 结合干扰配体以相同位点结合竞争，而用来识别那些与位点 1 或不同的位点结合的化合物。这就证明阿霉素缺少了 trNOE 和其他配体存在 trNOE。然而，必须强调的是，这些分析不能识别配体结合的确切位点，只能识别位点的不同或相同（见 7.4 节注意事项 9）。

7.3.4.1　方法 1：配体的加入顺序

各计算的预测位点 2 配体的加入顺序作为阴性对照，以证明这些配体是否与位点 1 结合而替代阿霉素。研究结果还表明，两个或更多个配体是否同时与 TetC 结合，从而为梭菌神经毒素检测试剂开发合成高亲和力配体（SHAL）确定合适的配体配对。

1）准备 TetC：阿霉素复合物浓度比例约为 50μmol/L/1000μmol/L 或 1∶20。收集 trNOESY 数据。

2）每个预测位点 2 配体按添加顺序大约 1mmol/L 的配体（表 7.2），每次加入后收集 trNOESY 数据。

3）每次加入配体后对 trNOESY 进行数据分析，以确定不管是属于阿霉素还是属于所加配体的交叉峰变弱、正数或消失的测定，表明阿霉素已经消失。强负性交叉峰的出现表明，配体能够同时与阿霉素结合，因此是连接另一个配体很好的候选配体（图 7.6）。

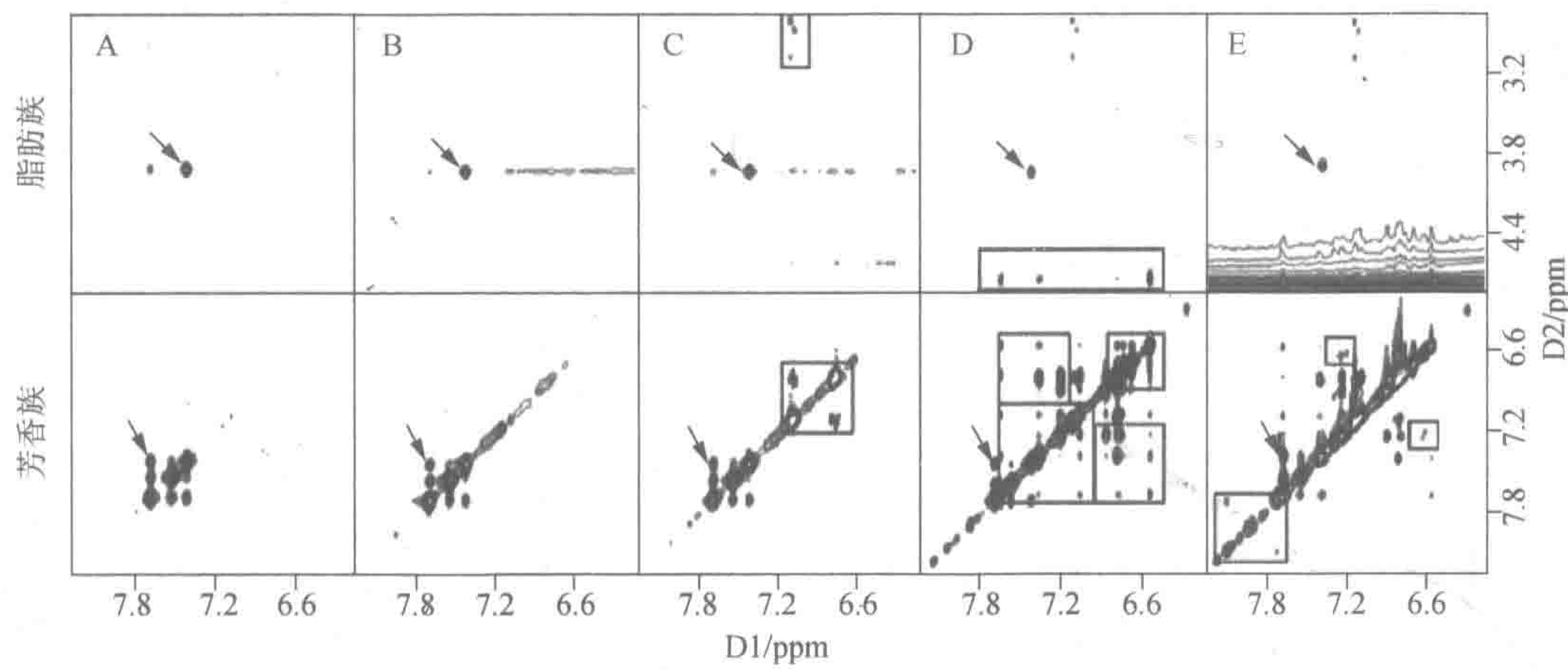


图 7.6　在预测配体位点 2 与 TetC 结合中阿霉素与位点 1 结合效果：TetC/配体复合物的二维 trNOESY 光谱在 20℃，200ms 混合时间的扩大的区域显示（A）阿霉素（位点 1 标记配体）的结合。箭头指示脂肪族和芳香族交叉峰，该交叉峰在（B）按的顺序添加 Sar-RGDSP、（C）SQNYPIV、（D）薰草菌素 A 和（E）萘基荧光素二β-D-芘喃半乳糖苷（NF-GalPyr）后阿霉素仍保持结合。出现新的、负的交叉峰以方框表示，这些交叉峰表明当阿霉素存在时 Sar - RGRSP 不结合，但两者 SQNYPIV 和薰草菌素 A 同时存在时则结合。加入 NF-GalPyr 时（E）出现部分取代薰草菌素 A，但不是阿霉素和 SQNYPIV

表 7.2　配体、TetC 浓度和结合活性评价

	配体名称	[配体]/(μmol/L)	[TetC]/(μmol/L)	[TetC]：[配体]	结合
图 7.6					
A	阿霉素	1018.4	54.3	1：20	是
B	肌氨酸-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸-脯氨酸	1116.3	50.6	1：22	否
C	SQNYPIV（氨基酸）	1050.6	47.4	1：22	是
D	薰草菌素 A	993.3	45.0	1：21	是
E	萘基荧光素二β-D-芘喃半乳糖苷	926.6	43.3	1：21	可能[a]
图 7.8					
A	唾液酸	386.7	22.3	1：17	否
BC	阿霉素	365.6	21.5	1：17	是，否[b]
C	3′-唾液乳糖	351.9	20.7	1：17	是

a. 发现沉淀会导致所有交叉峰密度的减少；b. 在图 7.8B 中观察到阿霉素结合，但在图 7.8C 中则观察不到

7.3.4.2　方法 2：配体与 TetC 反序结合的评价

重要的是进行阳性对照，或方法 1 中的反向实验。图 7.4 显示了各种配体，首先加入过量的 20 倍 TetC，以测定是否结合，而不受其他配体干扰。接着加入阿霉素到混合物中，确定它是否可以取代结合的配体，如果没有发生与配体 1 结合，证明蛋白质有活性。如果出现取代，则认为配体 1 的位点 1 结合能力表现出比标记的配体阿霉素较弱结合亲和力。接着，加入另一个配体，即配体 3，以确定配体 1 或阿霉素是否被取代。如果配体 1 被取代，但不是阿霉素，然后配体 1 和配体 3 必然竞争相同位点，配体 3 具有较高结合亲和力。短表列出了竞争分析的优化化合物，用这种策略产生的结果如图 7.7 所示。下面是该方法的分步步骤的例子。

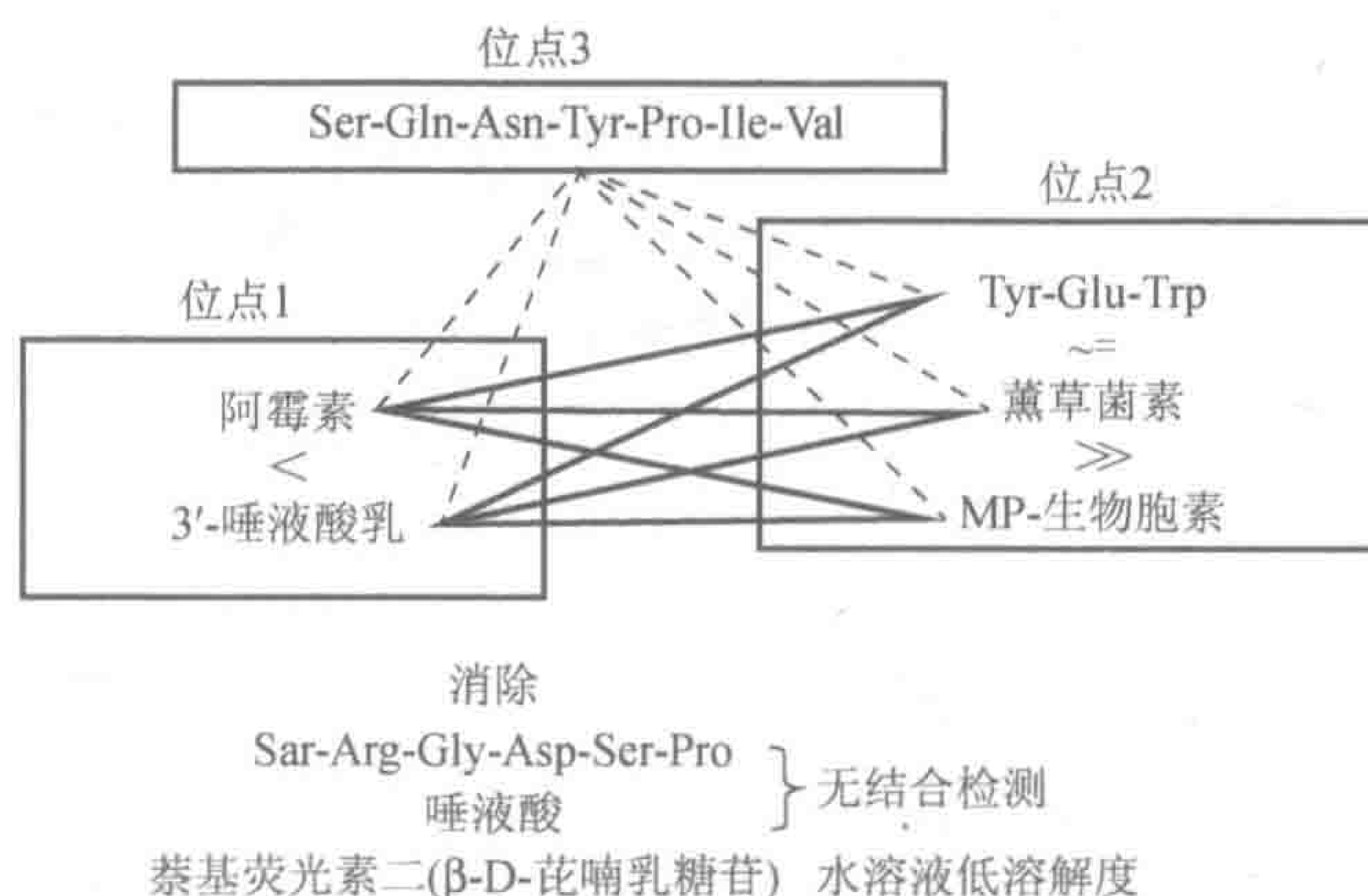


图 7.7　由 trNOESY 竞争法检测到的 TetC 三个不同的结合位点的优化配套配体分组。线表示，来自于每个位点的配体如何能够以独特的方式来开发的合成的高亲和力配体（SHAL）作为纳米传感器检测试剂。三种配体被淘汰，因为要么未检测结合要么配体不溶于水溶液

1）添加 20 倍过量的唾液酸到 TetC 中（表 7.2），并获得一个 300ms trNOESY 光谱（图 7.8A）。唾液酸不会出现结合。

2）加入 20 倍过量的阿霉素到唾液酸/TetC 溶液中。获得 300ms trNOESY 谱（图 7.8B），以确定该蛋白质并没有失去活性或该批次蛋白质失活了。

3）加入 20 倍过量的 3′-唾液乳糖（另一个位点 1 结合剂）到唾液酸/TetC/阿霉素溶液。获取 300ms trNOESY 谱。在这种情况下，3′-唾液乳糖将取代阿霉素，用 3′-唾液乳糖比阿霉素有更高的结合亲和力常数，证实两个配体与位点 1 结合。

7.3.4.3　方法 3：不同组合配体中 TetC 的加入

这种方法以更高通量的方式与 TetC 结合的方式同时筛选多个配体。能同时筛选多达 10 个配体，不过这套配体要先经过质谱分析方法预筛选，我们限制同时结合 3 个配体，如图 7.8 所示。做大量 trNOESY 实验损失的时间，很容易通过复杂性小而明确的数据集赢回损失的时间。在同样溶剂条件下，实验结果还提供了配体兼容性的关键信息。

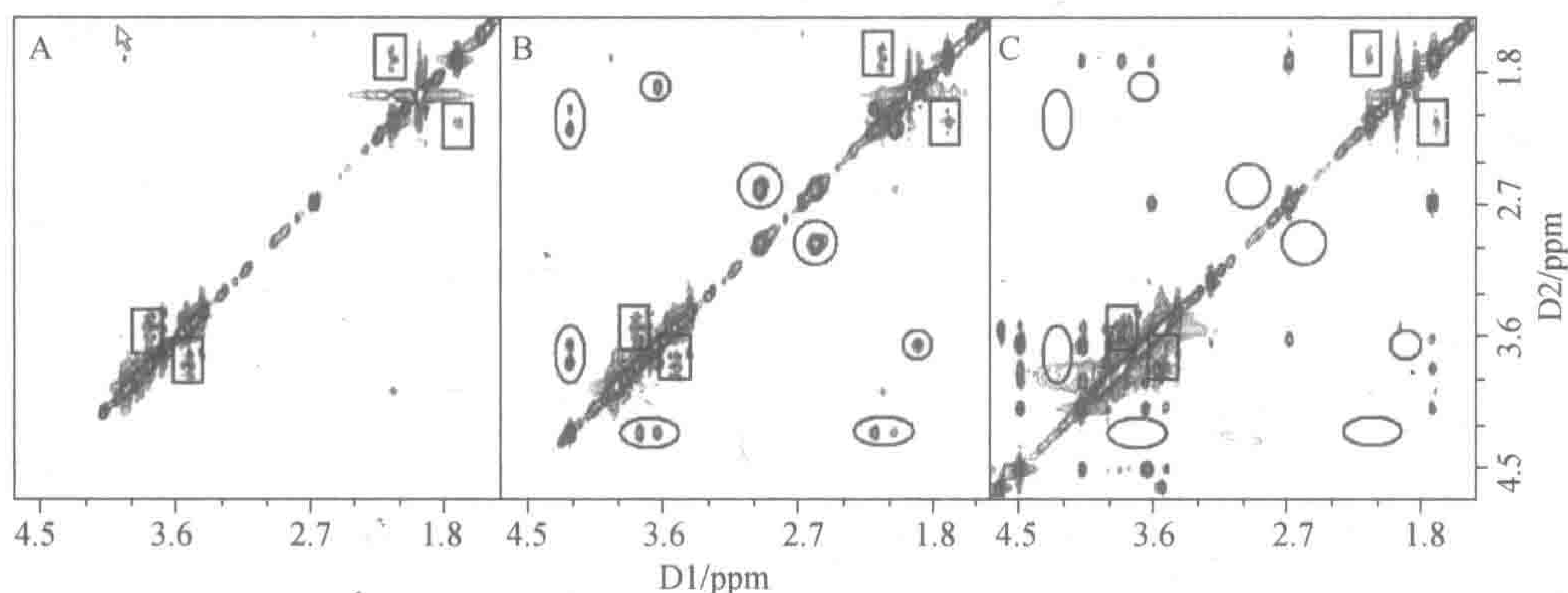


图 7.8　2℃ 300ms trNOESY 光谱(A)根据 trNOE(盒状灰色交叉峰)的证明，未出现唾液酸与 TetC 的结合。(B)根据强负性 trNOE(黑圆圈交叉峰)的证明，阿霉素与 TetC 和唾液酸混合物的加入导致阿霉素结合。(C)对唾液酸、阿霉素和 TetC 混合物加入 3′-唾液乳糖与表明 3′-唾液乳糖取代位点 1 上结合的阿霉素。阿霉素交叉峰(B)圈出的位置与(C)中盒状灰色唾液酸交叉峰进行比较

7.4　注 意 事 项

1. 当分子含有附着于大环系统的质子，如附着于阿霉素的四环系统的质子时，有时可观察到在缺乏 TetC 小分子的负核欧沃豪斯效应（NOE）交叉峰。这些质子比那些位于更加灵活的长碳链的质子展示较少的内部运动。然而，尽管对应于这些芳香共振的 trNOE 交叉峰的信号，不管 TetC 存在与否仍然是一样的，其强度总是对结合配体强多了。因此，必须考虑交叉峰的信号和强度，要与那些确实没有结合的配体区分开来。

2. 我们的实验是在 Varian Inova 600MHz 的分光光度计上进行的。虽然该实验可在较低级仪器上进行，但要求有高浓度蛋白质和配体，因为实验的灵敏度随磁场强度降低而减小。

3. 如果蛋白质浓度较高或蛋白质分子质量小，本步骤是唯一必要的。这两种情况下将导致蛋白质信号被可观测的配体信号所干扰。在我们实验情形中，保持 TetC 较低浓度（约 50μmol/L）。虽然可以在较高浓度（约 72μmol/L）检测 TetC 信号，但它们不干扰配体信号的检测。此外，如果 TetC 的分子质量足够大（51kDa），并且已知它是二聚体，那么蛋白质信号就会变宽延伸到基线。

4. 如果配体和蛋白质可溶于氘化溶剂和缓冲液，那么水信号的简单预饱和脉冲足可以消除任何残留的水信号。然而，如果样本需要在溶剂或含高比率 H_2O/D_2O 的缓冲液中制备，则有必要执行水抑制方案中的一个。

5. 在 2℃、10℃、20℃、30℃或 37℃时唾液酸不结合 TetC，证明在所有温度下存在光谱中弱阳性交叉峰。但是，Emsley 等[58]对 TetC/唾液酸复合物的晶体结构的研究表明，唾液酸与位点 1 相邻的位点结合。核磁共振（NMR）和 X 射线结果间差异的可能解释是，在我们测试的温度范围内唾液酸与小于 10^3mol/L 或大于 10^6mol/L 的 TetC 亲和结合。

6. 鉴于可以购买到干燥、冷冻干燥粉末 TetC，其他蛋白质可能不适用于干燥或由于会损害其活性或要冒出现沉淀的风险而不能干燥。在这些情况下，要么蛋白质对氘化缓冲液透析，要么在 90% H_2O/10% D_2O 中实验。

7. 标准的 5mm 管的核磁共振实验所需最小体积约为 500μl。然而，可以使用其他的 NMR 管和探针来代替，在蛋白质很稀少或具有有限溶解度的情况下，可以减少所需样品量。例如，用 5mm Shigemi 管（200～300μl）或微探针（2μl）来减少体积。但是，注意，这些选择更加昂贵，并不适用于每个核磁共振实验室。

8. 根据蛋白质的可用量，配体∶蛋白质为 5 和 50 之间。发现 TetC 与阿霉素的最佳摩尔比是 1∶15 和 1∶25。这些比率为大范围的结构上无关的配体提供了检测 trNOE 的良好灵敏度。

9. 需要考虑 trNOESY 竞争测定的一些局限性：两个或两个以上配体可以同时结合同一位点，不能完全排除仅根据它们的缺乏竞争的可能性。最近，Ma 等[59]提出蛋白质可与底物同时预先存在，像其构象灵活性的结果一样，为新来的配体呈现出各种不同的结合位点形状，这样的位点可能识别并结合多个不同的配体。假定配体只与一个位点特异性结合，可能不总是这样的情况。例如，*N*-乙酰半乳糖胺与 TetC 复合物晶体结构中的两个不同的位点结合[58]。同样，如果预测位点 2 配体与多个位点特异结合，更强的竞争者可以从一个位点取代它，但从其他位点不一定取代。在这样的情况下，配体将同时与 TetC 结合。配体与 TetC 的非特异性结合也是可能的，尤其是在非常高浓度的配体中。

致谢

我们要感谢 Felice Lightstone 所进行的计算研究，Maria Prieto 和 Loreen Zeller 进行的质谱分析实验。我们还要感谢美国能源部的化学和生物安全项目与劳伦斯利弗莫尔国家实验室探索项目 LDRD 01-ERD-046 的慷慨支持。本项工作的完成还得到了美国能源部劳伦斯利弗莫尔国家实验室 W-7405-Eng-48 项目的赞助。

参 考 文 献

[1] Pellecchia, M., Sem, D. S., and Wuthrich, K. (2002) NMR in drug discovery. Nat. Rev. Drug Discov. 1, 211–219.

[2] Pellecchia, M., Meininger, D., Dong, Q., Chang, E., Jack, R., and Sem, D. S. (2002) NMR-based structural characterization of large protein-ligand interactions. J. Biomol. NMR 22, 165–173.

[3] Peng, J. W., Lepre, C. A., Fejzo, J., Abdul-Manan, N., and Moore, J. M. (2001) Nuclear magnetic resonance-based approaches for lead generation in drug discovery. Methods Enzymol. 338, 202–230.

[4] Diercks, T., Coles, M., and Kessler, H. (2001) Applications of NMR in drug discovery. Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 285–291.

[5] vanDongen, M., Weigelt, J., Uppenberg, J., Schultz, J., and Wikstrom, M. (2002) Structure-based screening and design in drug discovery. Drug Discov. Today 7, 471–478.

[6] Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Mitchinson, C., and Green, N. M. (1982) ^{1}H-NMR studies on nucleotide binding to the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase: determination of the conformations of bound nucleotides by the

measurement of proton-proton transferred nuclear Overhauser enhancements. Eur. J. Biochem. 128, 113–117.

[7] Gronenborn, A. M. and Clore, G. M. (1982) Conformation of NAD^+ bound to yeast and horse liver alcohol dehydrogenase in solution: the use of the proton- proton transferred nuclear Overhauser enhancement. J. Mol. Biol. 157, 155–160.

[8] Roberts, G. C. K. (1999) NMR spectroscopy in structure-based drug design. Curr. Opin. Biotechnol. 10, 42–47.

[9] Blommers, M. J. J., Stark, W., Jones, C. E., Head, D., Owen, C. E., and Jahnke, W. (1999) Transferred cross-correlated relaxation complements transferred NOE: structure of an IL-4R-derived peptide bound to STAT-6. J. Am. Chem. Soc. 121, 1949–1953.

[10] Peng, J. W., Lepre, C. A., Fejzo, J., Abdul-Manan, N., and Moore, J. M. (2001) Nuclear magnetic resonance-based approaches for lead generation in drug discovery, in Methods in Enzymology: Nuclear Magnetic Resonance of Biologi- cal Macromolecules, Part A (James, T. L., Dotsch, V., and Schmitz, U., eds.), Academic, San Diego, pp. 202–229.

[11] Henrichsen, D., Ernst, B., Magnani, J. L., Wang, W. T., Meyer, B., and Peters, T. (1999) Bioaffinity NMR spectroscopy: identification of an E-selectin antagonist in a substance mixture by transfer NOE. Angew. Chem. Int. Ed. 38, 98–102.

[12] Cosman, M., Lightstone, F. C., Krishnan, V. V., Zeller, L., Prieto, M. C., Roe, D. C., and Balhorn, R. (2002) Identification of novel small molecules that bind to two different sites on the surface of tetanus toxin C fragment. Chem. Res. Toxicol. 15, 1218–1228.

[13] Dalvit, C., Flocco, M., Knapp, S., Mostardini, M., Perego, R., Stockman, B. J., Veronesi, M., and Varasi, M. (2002) High-throughput NMR-based screening with competition binding experiments. J. Am. Chem. Soc. 124, 7702–7709.

[14] Jahnke, W., Floersheim, P., Ostermeier, C., Zhang, X. L., Hemmig, R., Hurth, K., and Uzunov, D. P. (2002) NMR reporter screening for the detection of high-affinity ligands. Angew. Chem. Int. Ed. 41, 3420–3423.

[15] Jencks, W. P. (1980) What everyone wanted to know about tight binding and enzyme catalysis, but never thought of asking. Mol. Biol. Biochem. Biophys. 32, 3–25.

[16] Hajduk, P. J., Meadows, R. P., and Fesik, S. W. (1997) Discovering high-affinity ligands for proteins. Science 278, 497, 499.

[17] Henderson, D. A. (2000) Bioterrorism. Int. J. Clin. Pract. Suppl. 115, 32–36.

[18] Arnon, S. S., Schechter, R., and Ingleby, T. V., et al. (2001) Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. JAMA 285, 1059–1070.

[19] Montecucco, C. and Schiavo, G. (1995) Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. Q. Rev. Biophys. 28, 423–472.

[20] Kraus-Berthier, L., Jan, M., Guilbaud, N., Naze, M., Pierre, A., and Atassi, G. (2000) Histology and sensitivity to anticancer drugs of two human non-small cell lung carcinomas implanted in the pleural cavity of nude mice. Clin. Cancer Res. 6, 297–304.

[21] Friesen, C., Fulda, S., and Debatin, K. M. (1999) Cytotoxic drugs and the CD95 pathway. Leukemia 13, 1854–1858.

[22] Sparano, J.A. (1999) Doxorubicin/taxane combinations: cardiac toxicity and pharmacokinetics. Semin. Oncol. 26, 14–19.

[23] Onoda, T., Iinuma, H., Sasaki, Y., Hamada, M., Isshiki, K., Naganawa, H., Takeuchi, T., Tatsuta, K., and Umezawa, K. (1989) Isolation of a novel tyrosine kinase inhibitor, lavendustin A, from Streptomyces griseolavendus. J. Nat. Prod. 52, 1252–1257.

[24] Bothner-By, A. A. and Gassend, R. (1972) Binding of small molecules to pro- teins. Annu. NY Acad. Sci. 222, 668–676.

[25] Clore, G. M. and Gronenborn, A. M. (1982) Theory and applications of the transferred nuclear Overhauser effect to the study of the conformations of small ligands. J. Magn. Reson. 48, 402–417.

[26] Clore, G. M. and Gronenborn, A. M. (1983) Theory of the time dependent transferred nuclear Overhauser effect: application to the structural analysis of ligand-protein complexes in solution. J. Magn. Reson. 53, 423–442.

[27] Campbell, A. P. and Sykes, B. D. (1993) The 2-dimensional transferred nuclear Overhauser effect—theory and practice [review]. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 22, 99–122.

[28] Ni, F. and Scheraga, H.A. (1994) Use of the transferred nuclear Overhauser effect to determine the conformations of ligands bound to proteins. Accounts Chem. Res. 27, 257–264.

[29] Ni, F. (1994) Recent developments in transferred NOE methods. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 26, 517–606.

[30] Solomon, I. (1955) Relaxation process in a two-spin system. Phys. Rev. A 99, 559–565.

[31] McConnell, J. (1987) The Theory of Nuclear Magnetic Relaxation in Liquids, Cambridge University Press, New York.

[32] Kaplan, J. I. and Frankel, G. (1980) NMR of Chemically Exchanging Systems, Academic, New York.

[33] Krishnan, V.V., Murali, N., and Kumar, A. (1988) A diffusion equation approach to spin diffusion in biomolecules. J. Magn. Reson. 84, 255–267.

[34] Krishnan, V.V., Hegde, U., and Kumar, A. (1991) Spin diffusion in biomolecules: effect of higher order terms in transient NOE experiments. J. Magn. Reson. 94, 605–611.

[35] Landy, S. B. and Rao, B. D. N. (1989) Dynamical NOE in multiple-spin systems undergoing chemical exchange. J. Magn. Reson. 81, 371–377.

[36] Zheng, J. and Post, C. B. (1993) Protein indirect relaxation effects in exchange-transferred Noesy by a rate-matrix analysis. J. Magn. Reson. Ser. B 101, 262–270.

[37] Zabell, A. P. R. and Post, C. B. (2002) Intermolecular relaxation has little effect on intra-peptide exchange-transferred NOE intensities. J. Biomol. NMR 22, 303–315.

[38] Kumar, A., Ernst, R. R., and Wüthrich, K. (1980) A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. Biochem. Biophys. Res. Commun. 95, 1–6.

[39] Shaka, A. J., Lee, C. J., and Pines, A. (1998) Iterative schemes for bilinear operators: application to spin decoupling. J. Magn. Reson. 77, 274–293.

[40] Scherf, T. and Anglister, J. (1993) A T1r filtered two-dimensional transferred NOE spectrum for studying antibody interactions with peptide antigens. Biophys. J. 64, 754–761.

[41] Hwang, T. L. and Shaka, A. J. (1995) Water suppression that works—excitation sculpting using arbitrary waveforms and pulsed field gradients. J. Magn. Reson. Ser. A 112, 275–279.

[42] Smallcombe, S. H., Patt, S. L., and Keifer, P. A. (1995) Wet solvent suppression and its applications to Lc Nmr and high-resolution Nmr spectroscopy. J. Magn. Reson. Ser. A 117, 295–303.

[43] Ogg, R. J., Kingsley, R. B., and Taylor, J. S. (1994) Wet, a T-1- and B-1-insensitive water-suppression method for in vivo localized H-1 Nmr spectroscopy. J. Magn. Reson. Ser. B, 104, 1–10.

[44] Sklenar, V., Piotto, M., Leppik, R., and Saudek, V. (1993) Gradient-tailored water suppression for/sup 1/H-/sup 15/N HSQC experiments optimized to retain full sensitivity. J. Magn. Reson. A 102, 241–245.

[45] Liu, M. L., Mao, X. A., Ye, C. H., Huang, H., Nicholson, J. K., and Lindon, J. C. (1998) Improved watergate pulse sequences for solvent suppression in Nmr spec- troscopy. J. Magn. Reson. 132, 125–129.

[46] Noggle, J.H. and Schirmer, R.E. (1971) The Nuclear Overhauser Effect: Chemical Applications, Academic, New York.

[47] Knapp, M., Segelke, B., and Rupp, B. R. (1998) The 1.61 Angstrom structure of the tetanus toxin ganglioside binding region solved by MAD and MIR phase com- bination. Am. Crystallogr. Assoc. 25, 90.

[48] Umland, T. C., Wingert, L. M., Swaminathan, S., Furey, W. F., Schmidt, J. J., and Sax, M. (1997) Structure of the receptor binding fragment HC of tetanus neuro- toxin. Nat. Struct. Biol. 4, 788–792.

[49] Ewing, T. J., Makino, S., Skillman, A. G., and Kuntz, I. D. (2001) DOCK4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. J. Comput. Aided Mol. Des. 15, 411–428.

[50] DesJarlais, R. L., Sheridan, R. P., Seibel, G. L., Dixon, J. S., Kuntz, I. D., and Venkataraghavan, R. (1988) Using shape complementarity as an initial screen in designing ligands for a receptor binding site of known three-dimensional struc- ture. J. Med. Chem. 31, 722–729.

[51] Kuntz, I. D., Blaney, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R., and Ferrin, T. E. (1982) Ageometric approach to macromolecule-ligand interactions. J. Mol. Biol. 161, 269–288. 52.

[52] Meng, E. C., Shoichet, B. K., and Kuntz, I. D. (1992) Automated docking with grid-based energy evaluation. J. Computat. Chem. 13, 505–524.

[53] Pramanik, B. N., Bartner, P. L., Mirza, U. A., Liu, Y. H., and Ganguly, A. K. (1998) Electrospray ionization mass

spectrometry for the study of non-covalent complexes: an emerging technology. J. Mass Spectrom. 33, 911–920.

[54] Gao, J., Cheng, X., and Chen, R., et al. (1996) Screening derivatized peptide libraries for tight binding inhibitors to carbonic anhydrase II by electrospray ionization-mass spectrometry. J. Med. Chem. 39, 1949–1955.

[55] Eswaramoorthy, S., Kumaran, D., and Swaminathan, S. (2001) Crystallographic evidence for doxorubicin binding to the receptor-binding site in Clostridium botulinum neurotoxin B. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 57, 1743–1746.

[56] Swaminathan, S. and Eswaramoorthy, S. (2000) Structur alanalysis of the catalytic and binding domains of Clostridium botulinum neurotoxin type B. Nat. Struct. Biol. 7, 693–699.

[57] Lightstone, F. C., Prieto, M. C., Singh, A. K., Piqueras, M. C., Whittal, R. M., Knapp, M. S., Balhorn, R., and Roe, D. C. (2000) Identification of novel small molecule ligands that bind to tetanus toxin. Chem. Res. Toxicol. 13, 356–362. 58.

[58] Emsley, P., Fotinou, C., Black, I., Fairweather, N. F., Charles, I. G., Watts, C., Hewitt, E., and Isaacs, N. W. (2000) The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding. J. Biol. Chem. 275, 8889–8894.

[59] Ma, B., Shatsky, M., Wolfson, H. J., and Nussinov, R. (2002) Multiple diverse ligands binding at a single protein site: a matter of pre-existing populations. Protein Sci. 11, 184–197.

[60] Kraulis, P. J., Domaille, P. J., Campbellburk, S. L., Vanaken, T., and Laue, E. D. (1994) Solution structure and dynamics of ras P21-center-dot-GDP determined by heteronuclear 3-dimensional and 4-dimensional NMR spectroscopy. Biochem- istry 33, 3515–3531.

[61] Merritt, E. A. and Bacon, D. J. (1997) Raster 3D photorealistic molecular graphics. Methods Enzymol. 277, 505–524.

第 8 章　荧光光谱学研究蛋白质纳米级三维亚结构域

Pierre M. Viallet, Tuan Vo-Dinh

概　　述

在过去 20 年间，致力于蛋白质晶体结构数据库规模有了梦幻般的增加。此外，X 射线和核磁共振技术研究表明，属于同一家族蛋白通常共用全球相同三维体系结构。这些结果提示，蛋白质结构实验测定的需要，将减少怀疑有足够新颖结构的那些蛋白质。而且，核磁共振和其他技术已经证明，溶液中的蛋白质经历大规模出现恒定的随机热力学运动，范围从皮秒到秒也许小时。这样的变化可能有重要的功能性后果，但要确定那些功能相关的变化仍然是困难的事情，即使这个问题已用实验和计算方法解决。对于该特定的目的，还要有快速、准确监测构象变化（即发生在蛋白质的特定亚结构域）的方法。荧光共振能量转移（FRET）是一种合适的用于监控纳米级水平构象变化的工具。本章介绍了在溶液中、单个活细胞中、单分子水平上监测蛋白质三维亚结构域构象的各种荧光共振能量转移方法。

关键词： 荧光光谱法；荧光共振能量转移；荧光寿命成像测量；寿命测量；能量转移；近场扫描光学显微镜；蛋白质亚结构域

8.1　导　　论

在过去 20 年中蛋白质结构专门数据库规模有了巨大增长。除了已描绘具有惊人精度的越来越大的三维（3D）分子结晶结构的 X 射线研究外，核磁共振（NMR）和其他技术，已用于监测溶液中蛋白质的构象变化。现在认为，溶液中的蛋白质是在稳定的平衡结构中，感受了发生在时间尺度上从皮秒到秒，甚至小时的恒定随机热运动。核磁共振方法是非常有吸引力的方法，因为它们可以提供不同位点遍及大分子发生变动的全面信息。例如，^{15}N-NMR 弛豫研究表明，稳定的蛋白质主链的运动，通常被限制皮秒到纳秒时间尺度[1]。相比之下，^{13}C 或氘 NMR 弛豫方法所揭示的侧链动态，表明蛋白质疏水核心是动态的异质性[2~4]。除了主要研究致力于蛋白质折叠和伸展过程外，最近的论文还涉及（见参考文献[5]～[7]）与蛋白质功能相关的构象变化。随机热运动和平均构象两个方面，蛋白质与配体或底物结合时，对接另一个大分子或磷酸化时可能强烈地被修饰。这种变化可能有重要的功能性后果。尽管如此，确定哪些变化与功能相关是一个困难的

任务。甚至更有趣的挑战是，要监视底物添加到酶中时可能发生结构重排[7~10]。

监测构象变化可能需要使用几种研究技术[11]。有时与核磁共振研究、差分扫描量热法、远紫外线（UV）圆二色光谱（CD）等合作，广泛地应用于荧光标记物的标记及位点定向自旋标记等[11~14]。后两种方法提供围绕特定氨基酸的构象变化信息，但这可能是监测与酶活性相关的三维变化时的优势。所以，众所周知，属于同一家族蛋白通常共享同一整体三维构架。有人认为，先进的蛋白质结构模型将减少蛋白质整体三维结构实验测定的需要，因为当搞清楚了单个成员的结构时，描述家族中所有蛋白质结构才成为可能[15]。因此，必须重新考虑，出现在蛋白质特定位置上的构象变化容易监测的有兴趣方法，特别是当它用于体内监测发生的构象变化。有人可能会说，荧光和自旋标记两种方法对目的蛋白只需要少量修饰，不过通常还是要用核磁共振技术来研究。

在不同技术中，利用荧光、荧光共振能量转移（FRET）是最适合于构象改变监测，尽管也使用其他方法。当然，由于对荧光分子微环境有高灵敏度荧光量子产率，其他技术也适用。荧光强度或荧光寿命变化已应用于监测极性、疏水性和色氨酸环境酸度的变化，或连接蛋白质的荧光标签的变化。例如，丹酰基的荧光强度的 pH 灵敏度，已用于监测蛋白质结合的酰基分子和它的内源性氨基酸（赖氨酸）之间的质子转移[11]。然而，只有当两个参与分子间的距离小于 10nm 时，才会出现荧光共振能量转移独特性质。只有荧光共振能量转移在低于光衍射极限时，才能定量测定构象的微妙变化。另外，纳米级分子标准可以方便地用于活细胞中的测定。

8.2 方　　法

FRET 的基本原理已搞清楚很多年了[16~18]。FRET 包括导致来自荧光分子的首次激发态无辐射能量转移的量子力学过程，被称为供体（D），另一个荧光分子的首次激发态，称为受体（A）。其结果是，在随后给定的条件下，供体的激发可引起受体产生荧光（图 8.1）。对于 FRET 发生，可方便选择两个荧光：供体的发射光谱必须显著重叠受体的吸收光谱，并且由供体发出的荧光再吸收必须最小，以避免烦琐的数据修正（图 8.1，图 8.2）。此外，FRET 强度对荧光过渡偶极子的相对方位敏感。然后，由于 FRET 必须与激发态供体的失活过程竞争，供体应具有较高的荧光量子产率。最后，D 和 A 之间的距离必须小于 10nm，由于它们之间有 1/6 能量距离使 FRET 效率降低。这正是产生 FRET 探索蛋白质的构象和蛋白质构象变化的宝贵工具延续属性。此外，当 FRET 用于探测蛋白质构象变化时，D 和 A 对漂白必然是迟钝的，为此需要连续照射。

最近，FRET 技术开始应用于生物医学的研究[19,20]。事实上，由于如下原因，FRET 的数据对生物学活动的解释是一项艰巨的任务。一般，在已知经历不同的 3D 构象甚至共享同一自由能的生物分子群中进行观察。因此，即使数据收集必要时间是“理想的短”，数据将在同一个能级的分布反映单个分子，即它们的不同潜在三维构象的相对量。此外，

在足够短时间内与细胞内运动周期相比，该技术确实限制大量重要数据的收集。这样的情形，是收集信息的每种光学方法共同的，难以将实验值分配给精确的构象中。由于这些原因，FRET 经常被用来作为一个“全有或全无”的方法，将研究分子分成两个亚群，即 D-A＜10nm 出现 FRET，D-A＞10nm 就不产生 FRET。

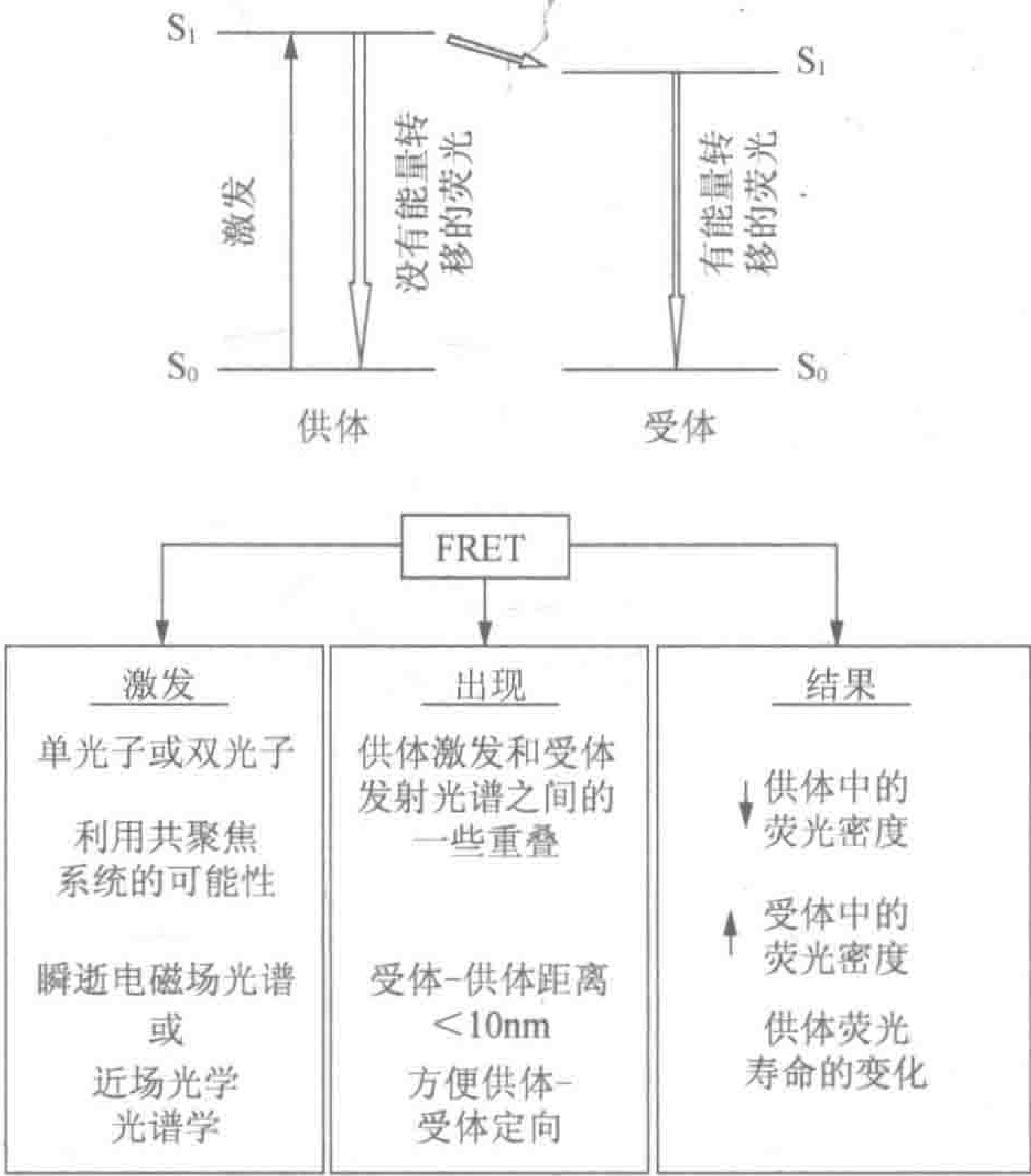


图 8.1 荧光共振能量转移原理

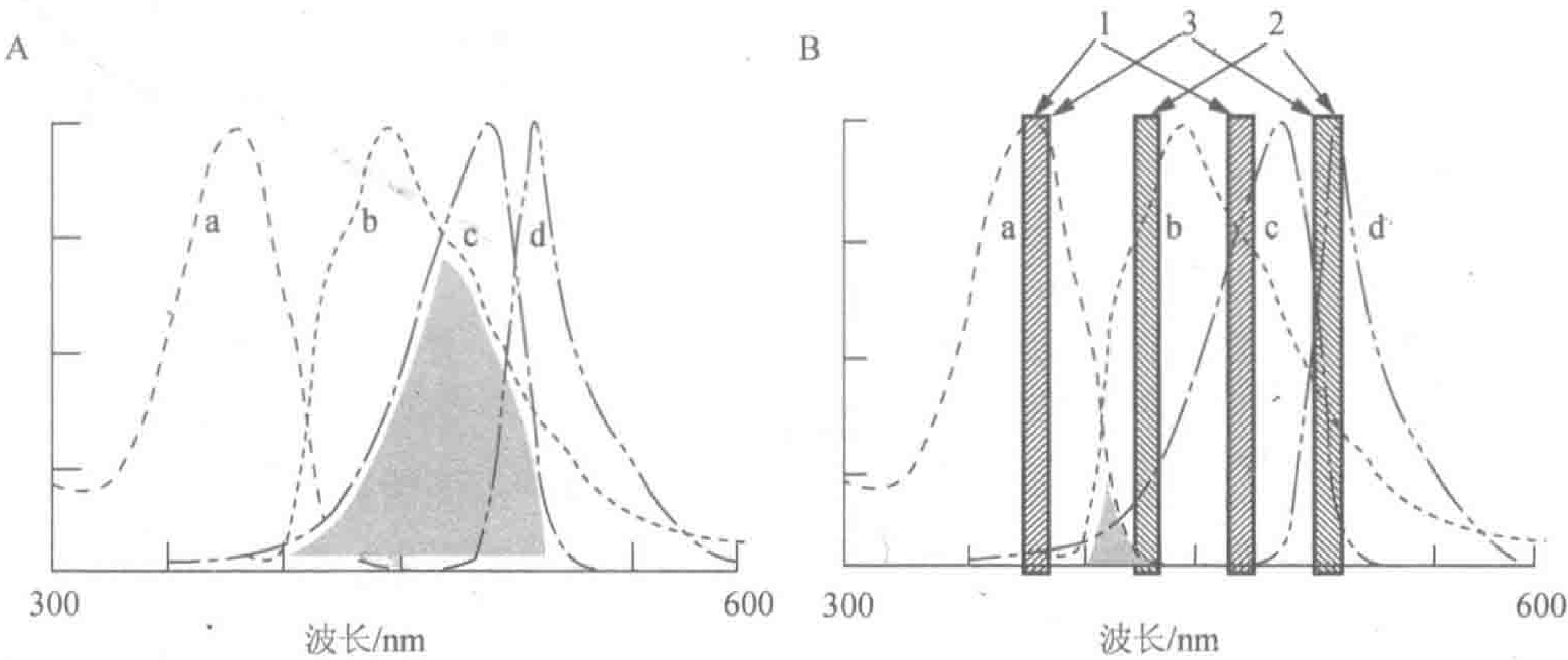


图 8.2 荧光共振能量转移。（A）FRET 所需的重叠光谱区域样品（灰色）：a.供体吸收光谱；b.受体吸收光谱；c.供体发射频谱；d.受体发射光谱。（B）所需的 FRET 最小过滤设置监测功能：1.记录捐助荧光强度；2.记录无 FRET 受体荧光强度；3.FRET 强度记录

如之前所指出的，FRET 可用于溶液中实验，用常规荧光分光光度计或显微镜研究

活细胞中生物分子。在后一种情况下，由于光经物镜浓缩，光漂白的风险高度增加。因此，除了利用直接单光子辐射，其他方法已经被开发出来。多光子显微镜产生“光学窗”优势，波长区为 700nm 和 1100nm，在这个波长区域生物材料对辐射几乎是透明的[21,22]。两个光子在 800nm 同时吸收允许到达第一激发态，因为它通常是用单一的 400nm 的光子进行。需要使用高能量，高频率（＜100fs）脉冲激光，两个连贯的光子同时“到达”荧光靶时，这种情况才能出现。双光子激发的效率遵循平方功率关系，并且只有样品在一个时间一个微小的体积内才能实现。然后全细胞不会被辐射损伤，光漂白的风险被限制为两个光子碰撞的微小容量。尽管如此，光漂白的某些风险在某些荧光探针中可能仍然存在[23]。

因为潜在漂白源是通过物镜的激发光浓缩，提示将细胞以另一种方式受辐射。细胞在薄石英板生长时，该板可以被用作一个激光光导，在板表面上一个足够长距离优先激发活细胞内的分子，以 0～100nm 诱导产生瞬态电磁场[24]。而且，这种简洁技术允许同时收集许多单个细胞数据（图 8.3）。

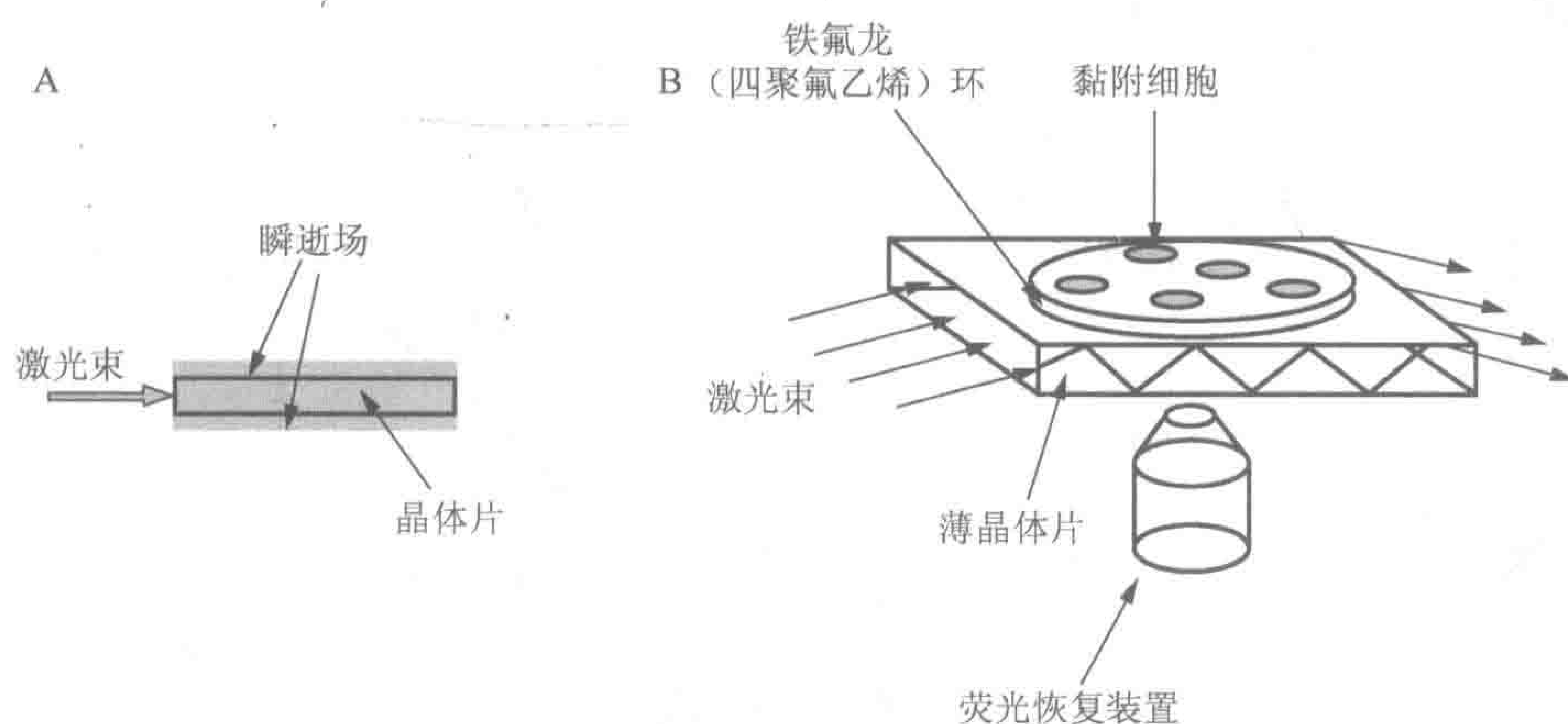


图 8.3　全内反射荧光显微镜。（A）石英板用于支持细胞辐照在板的两侧产生渐逝场。（B）设备插图允许许多细胞在一个时间内抓取数据

如图 8.1 所示，FRET 同时影响供体和受体的荧光强度，并改变供体的寿命。荧光强度或检测寿命的监测方法可以用于定量测定。在溶液中研究蛋白质的构象变化时，荧光分光光度计可作为常规设备（图 8.4）。从部分能量转移产生的荧光光谱，将是供体和受体的各荧光光谱的组合。这些光谱的相对量将取决于供体和受体，对用于激发波长的相应量子产率。这些光谱的相对贡献，甚至在其他的荧光或相对噪声信号存在中，使用先前公布的光谱分辨率方法容易地获得[25]。与此相反，在活细胞进行的实验需要使用激发和发射过滤装置（图 8.5）[26]。一般需要使用三套滤波片，这是耗时的实验[27]。通过使用拥有它们各自激发光谱最小重叠，和选择超出重叠范围激发波长的荧光简化实验。如图 8.2B 所示，第一组过滤器分别监测供体和受体荧光整体变化，第二组只测量受体荧光从化学微环境（无 FRET）产生的变化。这些数据的组合监测 FRET 特异性变化。

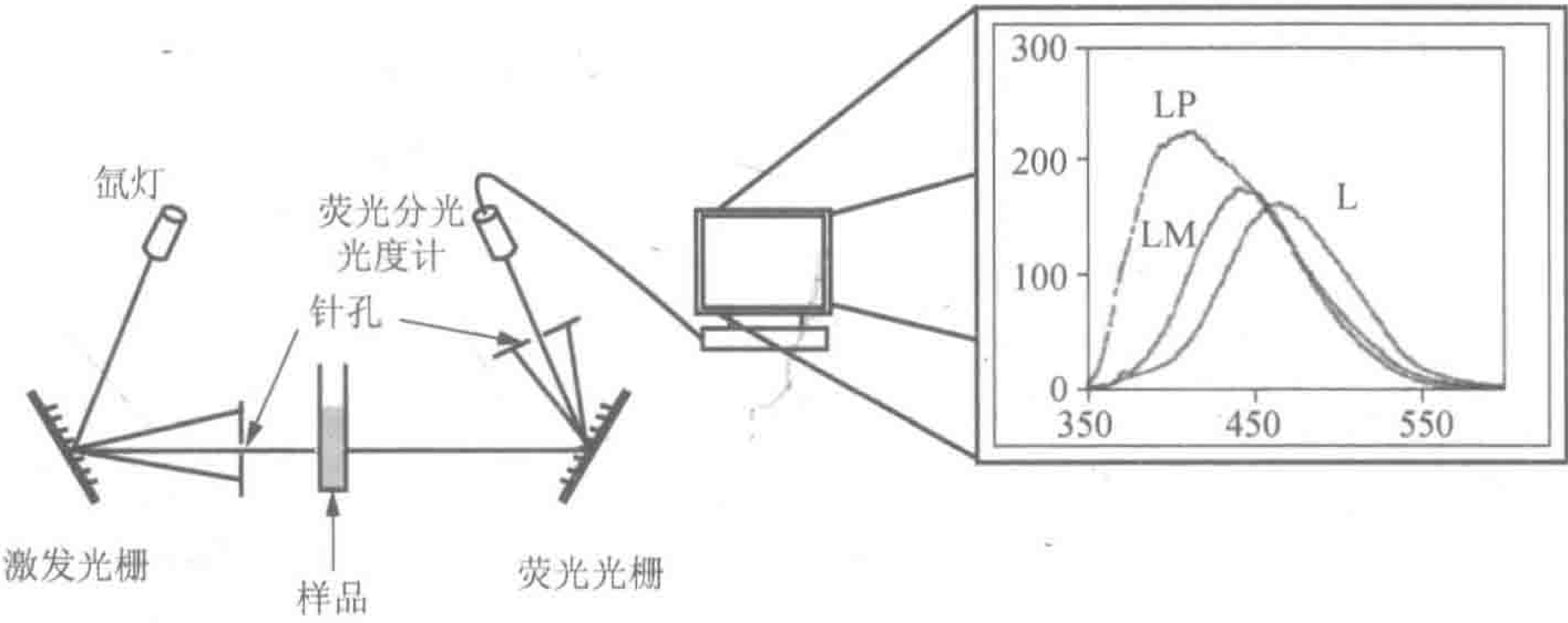


图 8.4　传统的荧光分光光度计（PM）光电倍增器的示意图。图中分别为结合蛋白（LP）、结合离子（LM）及游离（L）荧光探针 Mag-indo 1 的荧光光谱

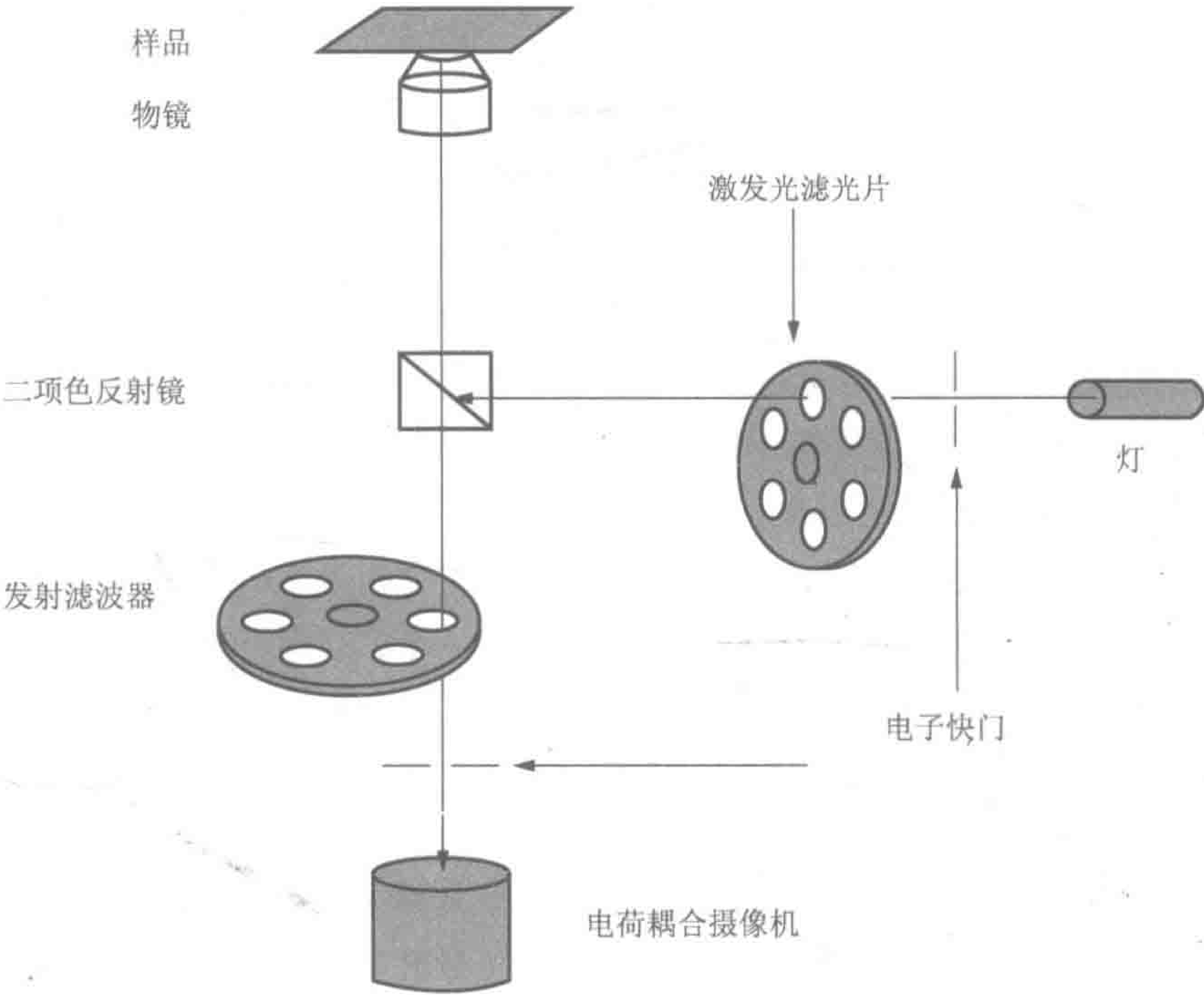


图 8.5　FRET 多波长荧光成像显微镜示意图（不按比例）。电子百叶窗是必要的，以尽量减少在不同波长强度和数据记录产生的细胞辐射。CCD. 图像传感器

时间寿命测量，也可用于无论是在蛋白质溶液中还是在活细胞中 FRET 的定量。荧光寿命是独立的荧光聚集，其中一个重要的优点是，探针集中预测不同活细胞内的变化。与此相反，寿命强烈地依赖于探针和化学环境之间的分子相互作用。预测能量转移本身影响供体的寿命，因为它与供体激发态等失活过程竞争。因此，3D 构象变化引起的能量转移的变化将以复合体方式影响供体寿命。然而，最近荧光寿命成像被广泛用于 FRET 监测[28~30]。已使用两种根本不同的方法。在时域方法中，用光的短脉冲或用比荧光寿命更短的脉冲激发试样来检测荧光寿命（τ_f）（图 8.6）。这种方法需要一个有快门的照相机，

能在[31~33]精确短时间内收集荧光信号。使用时域方法，在荧光衰减寿命期间收集信息时，受到照相机快门快慢难度的限制（图 8.6A）。

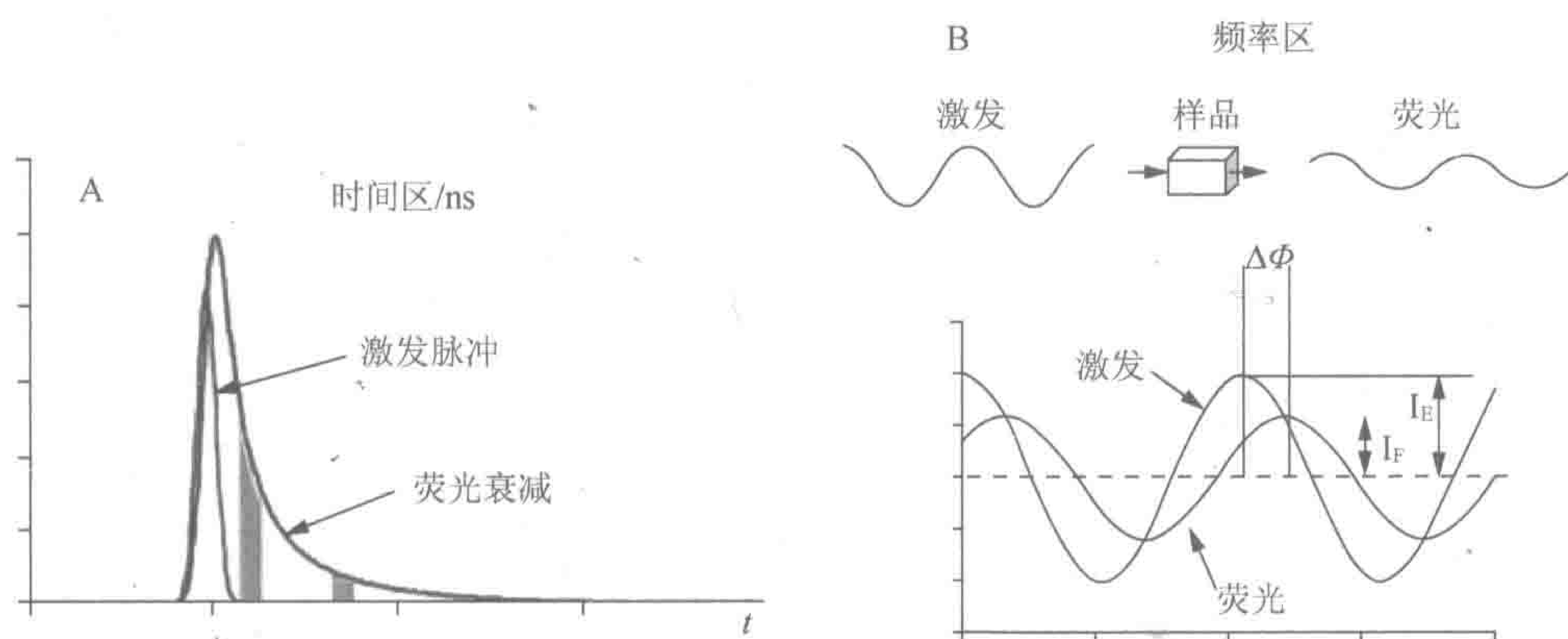


图 8.6　荧光寿命成像。（A）在时间区域方法中，通过很短的激发脉冲（细曲线）激发荧光（粗体曲线）多指数衰减，用相机快门重复记录非常短周期时间（灰色）内的数据。（B）在频率区域途径中，可测量的参数是相移 $\Delta\Phi$ 和相对减少的荧光信号（I_F）射幅与激发脉冲（I_E）相比较

在频域的方法中，用正弦调制光激发样品。光的光角频率与测量的荧光寿命互惠。其结果是，所发射的荧光以相同的频率被正弦调制，但减少了调制深度，*M*，并发生相移，$\Delta\Phi$（图 8.6B）。这种技术需要能够高频率调制检测器。相关的激发脉冲的各自强度和荧光信号，并以相移 $\Delta\varphi$ 的参数，用于计算其他两个参数、相寿命 τ_f 和调制寿命 τ_M。只有当样本仅包含一种荧光物质，这些最后的寿命才会相等，由于分子间的相互作用，在细胞内无此情况。当多于一个的荧光品种存在时，相位和调制寿命就不相同。在这样的状况下，真正的寿命组合物可以通过在一定频率范围内测量相位和调制寿命，并将结果拟合到一组分散的关系来获得。由于光谱识别若干优势，荧光寿命成像测量（FLIM）不久的将来可能会成为新常态。在使用较低的光剂量并减少对细胞的光化学损伤的风险时，要同时读出数据只需要增加一种二色性和长通发射滤波器就行。最近的论文报道了数据的数值分析进展和多波长频域 FLIM [34~38]的可行性。

8.3　结　果

在氨基酸中，只有色氨酸有显著荧光且荧光需要激发波长，该波长不能穿过大多数显微镜的物镜。因此，蛋白质必须预先用荧光化学物质标记，从而通过荧光技术的变化研究它们的构象。根据蛋白质和实际目标使用不同标记过程。接下来以实例进行详细讨论。

8.3.1　非共价结合

众所周知，一些化学物质优先位于蛋白质三维结构的特定口袋内。当荧光用于报道

特异性亚区域内和在特异性区域周围环境中构象变化时，大多数的荧光对化学微环境变化敏感。与特定氨基酸非共价结合而优先定位结果属于特殊的情况。然后，可通过化学改变微环境，即改变结合条件甚至两者同时改变，可以影响荧光性质从而改变蛋白质的构象。有时，外源性荧光的结合，可诱导相邻色氨酸产生能量转移，这使通过 FRET 技术探索相互作用成为可能。

几年前，荧光化学最初用于探测细胞内钙离子浓度的双发射波长颜料：Mag-indo 1，证明一些蛋白质能够通过与一些组氨酸残基非共价结合有相互作用。这样的结合，诱导双发射波长颜料 Mag-indo 1 荧光光谱的特异性变化，使得用特定数据处理量化这种结合成为可能（图 8.4）[25,26,39]。在无钙条件下，用同步荧光技术研究了双发射波长颜料 Mag-indo 1 与火鸡卵清溶菌酶（Tlys）的相互作用[40,41]。该技术中，激发和发射两个波长与一个常数 $\delta\lambda$ 同时扫描，压缩相对窄域波长频谱信息。这样通常减少了来自各个荧光成分频谱的重叠。这项研究同时记录游离 Mag-indo 1、蛋白质与 Mag-indo 1 结合和蛋白质本身的同步荧光光谱。另外，从蛋白质色氨酸的潜在能量转移，不影响该蛋白质与 Mag-indo 1 结合的同步荧光光谱的荧光强度。可以很容易获得互作解离常数特性值。与此相反，改变蛋白质的荧光光谱强度，可能反映接近相互作用位点色氨酸的化学微环境的改变和蛋白质与 Mag-indo 1 结合的这个色氨酸一些能量转移。当色氨酸在吸收波长范围内激发时，通过改变 Mag-indo 1 强度监测相互作用时发生能量转移[42]。此外，Tlys 的氨基酸序列只有两个组氨酸残基，并且它们中只有一个组氨酸 121 位于稳定三维构象中色氨酸附近。因此，通过这种相互作用，根据存在的一些能量转移，很容易确定蛋白质易感亚基结构域（图 8.7）。

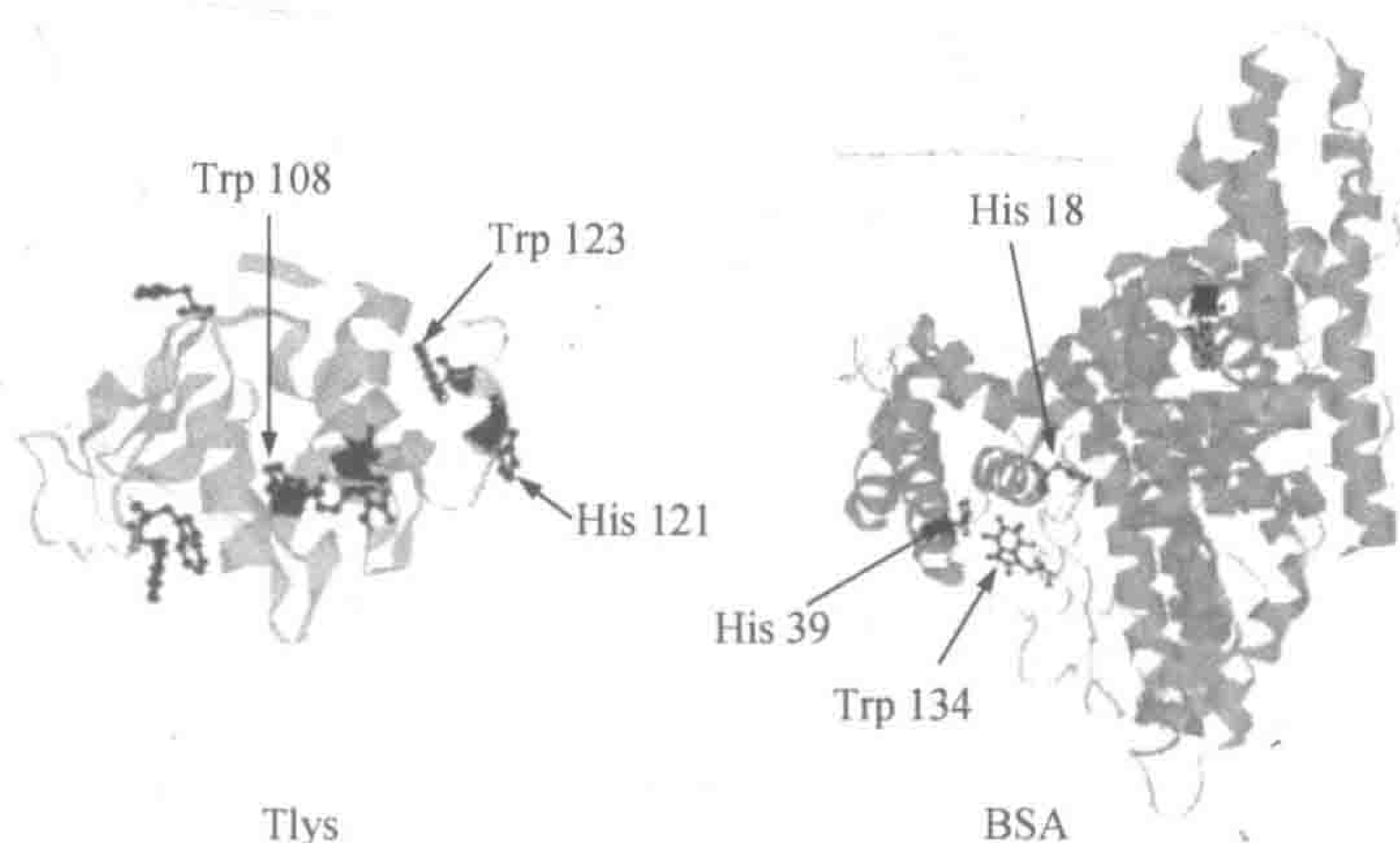


图 8.7　火鸡卵清溶菌酶 Tlys（左）与牛血清白蛋白 BSA（右）的 3D 构象。色氨酸和组氨酸残基的化学结构以球状和棒状表示

荧光技术也用于监测荧光底物（4-甲基伞形酮基二糖糖苷或三糖糖苷）与火鸡或鸡卵清溶菌酶结合产生的构象变化。在这两种情况下，当底物被酶裂解消失时，观察到蛋白质荧光的猝灭，但没有证实有能量转移。这一发现提示，淬火只出现在色氨酸化学环境变化时，108 位的色氨酸大概与间隙内存在的底物结合（结果未发表）。

也研究了牛血清白蛋白（BSA）和人血清白蛋白（HSA）与 Mag-indo 1 的相互作

用[42]。同源蛋白质有两个疏水口袋，但色氨酸残基数目不同：BSA 有两个色氨酸，每个疏水口袋内各一个，但 HSA 只有一个，BSA 缺乏 134 位的色氨酸。由此表明，这两种蛋白质与蛋白质探针平行结合的 Mag-indo 1 的相互作用。这种结果提示，Mag-indo 1 发生在 134 位色氨酸临近的相互作用，存在盐酸胍时可用于检测 BSA 亚结构域的伸展和再折叠[43]。

最近，认为曙红分别与 BSA 和 HSA 相互作用来自于构象变化点（J. M. Salmon 和 L. Bilia，个人通信 2001）。曙红与这些蛋白质的相互作用，诱导强度增加和产生相互作用的定量的曙红荧光光谱红移。人血清白蛋白的相互作用的化学计量为 1/1，牛血清白蛋白为 1/2。此外，这种相互作用引起 BSA 的两个色氨酸荧光的猝灭（图 8.8）。获得的结果与 HSA 进行比较证实，曙红互作发生在氨基酸位于 BSA 的两个疏水口袋内。

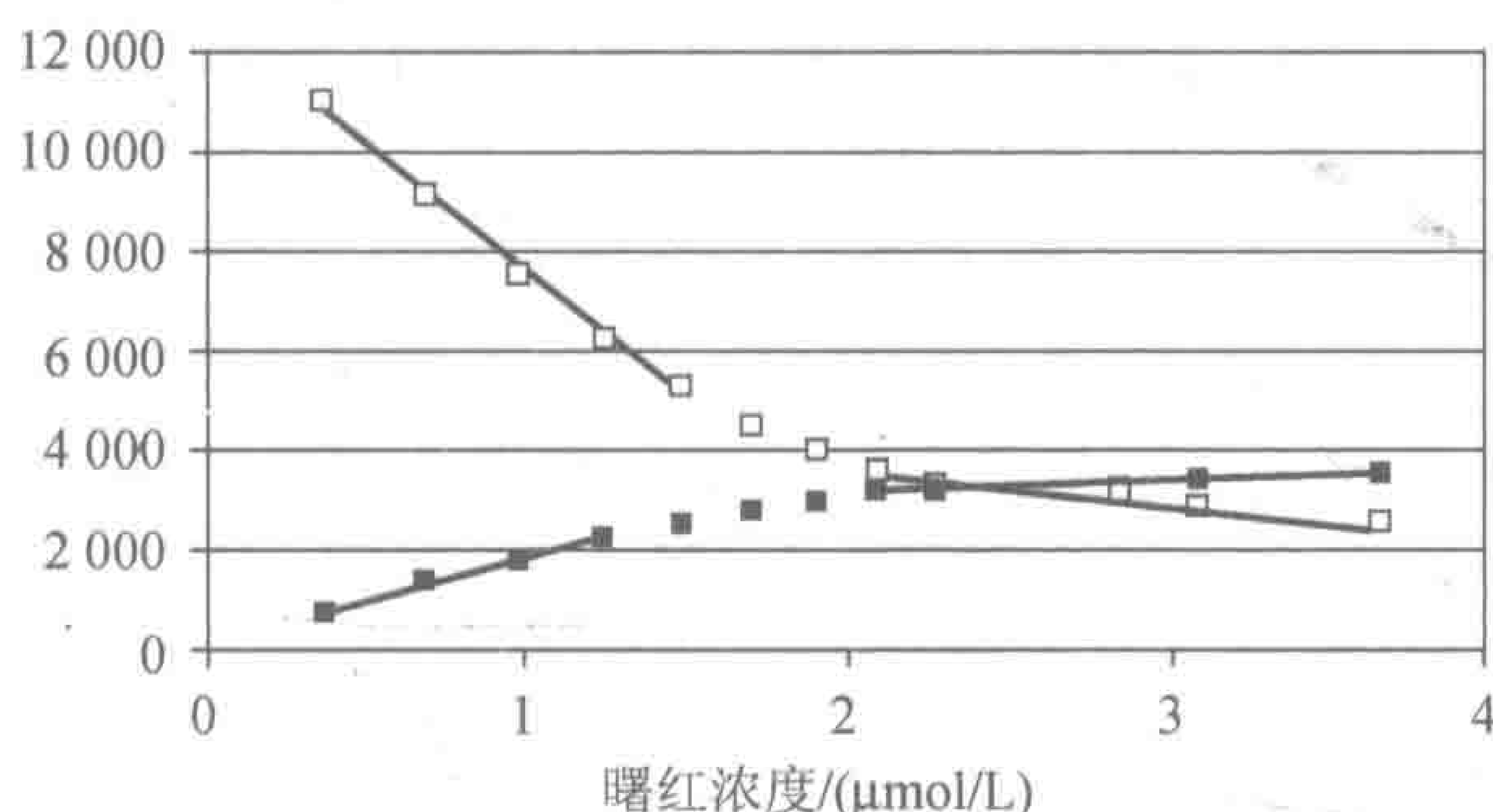


图 8.8 BSA 色氨酸荧光强度上增强曙红浓度的影响（□）的和 BSA 结合曙红的荧光强度（■）。在 y 轴荧光强度是任意单位。BSA 的浓度为 1.8μmol/L

8.3.2 绿色荧光蛋白变异体标记的蛋白质

绿色荧光蛋白（GFP）是一种 27kDa 的（238 个氨基酸残基）来自维多利加多管发光水母（*Aequorea victoria*）的自发荧光多肽，它吸收紫外线的蓝色光并在光谱绿色区域中发射光谱[44]。最近详细综述了活细胞中研究其结构和潜在用途[45~50]。GFP 生色结果来自环化的 3 个相邻氨基酸（S65、Y66 和 G67）和酪氨酸[45~50]，以及后续的 1,2-脱氢酪氨酸。虽然本身能够吸收光而发色，但它的荧光特性与一个 11 链β桶状结构的存在相关联。GFP 已经在细菌和真核细胞中表达，并经 mRNA 体外翻译产生 GFP。然而，GFP 对异源蛋白质的 N 端和 C 端保持其荧光，且结合通常不影响标记蛋白质的功能[45,46,49]。开辟了 GFP 应用途径，作为细胞内的报道基因，即使天然 GFP 的荧光强度用在细胞内还不够亮。工程上改造的变体具有更好的与光源匹配的不同激发和发射光谱[46,48~50]。还发现有必要，在特定的细胞微环境中[46~50]表达水平低的情况下，需要使用更亮的突变体。他们中的一些已被专门设计［如青色（ECFP）和黄色（EYFP）荧光蛋白］作为匹配 FRET 的标准。

虽然使用 GFP 和变异体 GFP 嵌合体在蛋白质合成、转录和细胞内定位已有了令人瞩目的信息，但由于它们的结构，限制了它们在监测蛋白质构象变化的用途。根据它们自身大小，标记小分子蛋白质时，变异体 GFP 可修改构型变化的动力学。此外，这些变体与标记蛋白质 N 端或 C 端融合，这个不是与其他蛋白质或酶底物结合产生的构象变化

敏感的位置。感谢最近结构基因组学的进展，使得更容易确定哪些可以改变，高于或低于10nm的N端和C端，标记距离的蛋白质的生物活性类型[15]。

事实上，已经证明GFP嵌合体对蛋白质功能研究的潜力。最近的评论文章已很好地涵盖了这一研究领域（见参考文献[28]、[46]、[47]、[51]、[52]）。分子内FRET用于监测蛋白质活性，特别用于检测紫外线诱导的细胞凋亡和测试新的凋亡诱导剂或抑制剂[53~57]。当底物完整时，为了显示荧光共振能量转移（FRET），所有的研究都使用标记的半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶（又称胱天蛋白酶caspase）荧光底物来完成。活性的半胱天冬蛋白酶裂解底物，诱导FRET消失。不幸的是，这种监测酶的活性简洁方法，无法提供有关蛋白质潜在的构象变化的任何信息。

磷酸化是转录后修饰蛋白质，调节蛋白质功能的有效方式。通过FRET方法监测磷酸化已经实验了很多不同方法。在特殊情况下，如果该肽可以在绿色荧光蛋白突变体两端标记，通过FRET方法可以证实磷酸化诱导构象的显著变化。在这个方案中，对给定的蛋白激酶，基于适合底物肽序列双标记构建了报道嵌合体[58,59]。在这种方法中，柔性连接序列和与磷酸化底物结构域结合的磷酸化识别结构域，都内藏于两个GFP变异体之间。因此，磷酸化诱导了构象巨大的改变，这将改变GFP突变体之间的距离和（或）相对方向。这些变化将改变GFP突变体之间的FRET条件。原则上，这种方法可以扩展到任何类型的激酶，以及能在细菌和哺乳动物细胞中表达的特异性报道蛋白[60,61]。然而，虽然允许有效监测激酶的活性，但这种方法不会提供，磷酸化期间或磷酸化过程中激酶经历的构象变化的任何信息。

分子间的荧光共振能量转移技术，也应用于监测细胞核受体和它的瞬时转染，和染色体整合报道基因的转录所必需的专一性活化剂之间的相互作用[62]。高分辨率FRET显微镜用于海拉（HeLa，实验用增殖表皮癌细胞）细胞中的质膜霍乱毒素β亚基和GPI锚定的蛋白质之间的相互作用中“脂筏”潜在作用的研究[63]。也使用FRET成像，监测表皮生长因子受体和活细胞中的生长因子受体结合蛋白2（Grb2）相互作用[64]。另外，在Janetopoulos等的一项研究中[65]，由融合于青色和黄色荧光蛋白α和β亚基[65]之间的FRET监测受体介导的异三聚体G蛋白的活化，实施了活细胞内可视化。特别值得一提的是，他们的研究方案允许同时测定活细胞和组织中G蛋白的动力学和活化位点。为此目的，盘基网柄菌（*Dictyostelium discoideum*）亚基Gα2和Gβ分别标记青色和黄色荧光蛋白。用FRET强度监测G蛋白浓度变化，报道G蛋白活性和相关的构象变化。

8.3.3 其他类型的共价结合

1995年证明75位上的赖氨酸是钙调蛋白最具反应性的残基，并因此广泛地标记和选择钙调素与氨基反应性荧光处理钙[66~69]。用这个标记处理建立Ca^{2+}与钙调蛋白的结合可视化的荧光蛋白，监测钙调蛋白的钙激活依赖性和钙非依赖性的定位，并了解钙调蛋白在有丝分裂过渡的控制作用[66,67,70]。此外，发现这种结合，对胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶消化蛋白不敏感，通过肽特征的常规方法很容易识别结合位点。用荧光标记的化学标记蛋白的另一种潜在有趣的方法，适用于半胱氨酸残基，该残基与其他氨基酸频率相比，通常受到蛋白质序列中存在的数量限制。

科学家致力于蛋白质和酶-底物复合物的三维结构的确定，而进行密切的科学合作，那么这些化学结合的潜在用途将会增强。科学工作者感兴趣的荧光小分子的蛋白质化学标记，最近出版的 3D 结构，将利用这种优势作为在氨基酸序列中最佳候选物的证明[71]。当荧光类似物合成以后，科学家可受益于强大的结晶、X 射线和核磁共振技术，以检查标记物是否诱导了三维构象中不希望的变化。

最近已开发了另一个令人兴奋的方法，即蛋白质特定结构域的化学合成。此方法利用蛋白质三维构象数据库和进展中蛋白质组学的充分优势，用于研究来自大肠杆菌的 2-酮戊二酸脱氢酶多酶复合物结合的，二氢硫辛酰胺琥珀酰（E2 亚单位）的，二氢硫辛酰胺琥珀酰转移酶前亚单位结构域的解折叠[11]。这个合成的蛋白质，用萘基丙氨酸在羧基端标记，通过 FRET 技术研究解折叠时，端与端距离的变化。差分扫描量热法和远紫外圆二色法也被用于本研究。

通过基因组方案与标记比较，化学标记可以呈现一些特异性缺乏的东西。用于化学结合的氨基酸，一般不是蛋白质氨基酸序列中唯一的氨基酸。因此，与钙调蛋白相反的是，它可以预测化学标记，可能产生不同标记蛋白质和潜在的多重标记蛋白。尽管这可能需要进一步纯化、分离标记的蛋白质，但可以证明对探测不同亚结构域构象变化是有用的。在任何情况下，化学标记似乎可替代 GFP 标记，允许使用小得多的荧光标记物。它可以为研究人员提供荧光类似物，而在溶液中匹配蛋白质构象变化研究所有的要求。这些修饰的蛋白质对于研究电穿孔的疗效或辅助细胞内吞作用的任何过程也应该有效[72~77]。

8.4　下一步做什么？

无论 FRET 方法在蛋白质的活性和构象变化中产生任何有价值的信息，这些信息一般都是从分子群中收集数据而获得。因为它一般承认许多三维构象与自由能的同一水平相一致，这样的数据可能也反映了分子群体的异质性或表征的均匀中间构象。出于这个原因，必须探索单分子构象变化可视化的方法，特别是用于监测蛋白质活性期间发生的中间构型。虽然早期的光学方法致力于大分子监测扩散，但最近的发展主要集中在所谓的“动态结构生物学”。在这样的研究领域，需要检测位于大分子上或两个不同的大分子上，两个精确位点之间的距离和定向变化的方法。荧光共振能量转移（FRET）和荧光偏振各向异性（FPA）两种光学方法，最近被改编为单分子检测[78]。而 FRET 效率取决于两者的相对距离及供体和受体的取向，FPA 效率则仅仅取决于荧光定向的变化。因此，最佳的实验是同时使用这两种技术，不过这样的情形很少遇到。一方面，每一种大分子荧光偏振向异性只需要一种荧光标记，这就限制了化学合成的研究。另一方面，荧光偏振向异性由相同方向作为激发光（I_{par}）的荧光极化强度与垂直方向激发光（I_{perp}）的极化荧光强度进行比较。这样的比较在信号强度低并存在大背景信号时，可能难以量化。然而，当荧光紧密附着或拴在大分子上时，FPA 的变化可以解释为，该大分子的角运动，但平均堆积可能掩盖定向动态变化的重要信息。

由于低强度信号，记录来自单分子发出的荧光不是一件容易的事。首先，必须确保

所记录的信号是真实来自独特的分子，通常通过使用超低荧光浓度和共聚焦显微镜检查来实现。作为一个实例，荧光分子的浓度通常在 10～30pmol。在这些条件下，衍射限制激发体积约 0.5fl，与 5×10^{-5} 双链分子同时占用的概率进行比较，单分子的出现概率约为 0.01。因此，信号强度通常比背景值要低得多，特别是当在活细胞中测量时，必须在这样的背景下进行萃取。这可以使用单光子计数雪崩光电二极管来实现，检测单分子光子猝发，与大多数生物活动（<1ms）的速率兼容的积分时间。

已经开发了单对荧光共振能量转移（spFRET）技术和单分子荧光偏振各向异性（smFPA）技术用于观察构象波动和酶催化活性单分子分辨率。他们首先用于研究构象变化和葡萄球菌核酸酶（SNase）的相互作用[79]。在这项研究中，测定供体之间的分子内 spFRET 和到借助于 6 个组氨酸标记标签，固定化于玻璃盖玻片上的单个 SNase 蛋白受体附加荧光。通过测定单标记 SNase 完成 SMFPA 实验，同时测定受供体标记 SNase 和受体标记 DNA 底物之间的分子间 spFRET。spFRET 的用途已经延伸到单分子胰凝乳蛋白酶抑制剂 2，在溶液中变性时构象变化的研究[80]。虽然已使用荧光嵌合物，如转铁蛋白-四甲基罗丹明，在单个活细胞中检测单分子，但是 spFRET 技术好像还尚未在活细胞中使用[81]。这种情形的原因可能是，在活细胞中，自发荧光会导致过大的背景信号。尽管如此，在另一个最近的研究中，对天然肌细胞膜的脂质微区的横向运动进行了成像，这可以被视为单分子显微镜在活细胞中一个示范性应用[82]。最近也研究了单分子水平上 GFP 标记的膜结合蛋白行为[83~85]。

据我们所知，荧光偏振各向异性（smFPA）的生物应用，首次报道是关于细丝滑过，固定在玻璃表面的球蛋白马达分子的轴向旋转[86]。一年后研究了相同生物系统中的肌球蛋白马达的构象状态[87]。单荧光强度的定向依赖性被用于真实检测 F1-ATP 酶构象的变化。用标记荧光素 Cy3 的荧光附加到该分子的中心亚基，在离散 120°的台阶中显示亚基旋转，每个台阶由一个腺苷三磷酸分子[88]的水解而驱动。虽然这些实验是用酶固定在玻璃表面上完成的，但他们引出了分子马达转速研究的途径。

很显然，在细胞内 spFRET 和 smFPA 两者的应用，需要增加信号/背景值。这不能从增加融合时间上产生，必须保持在毫秒范围内与细胞内事件的速度相一致。同样，采集速率有其自身的技术限制。因此，为了增加信号/背景值的最有效方法是降低背景强度，这可以通过减小照射细胞体积来实现。现在三种光学技术都适用于这一目的。

由于在全内角反射荧光显微镜奇妙背景排斥，该技术似乎非常适合用于检测低强度的信号。最近已用它监测细胞内的活动，如趋化信号、蛋白质的核质运输和肌动蛋白丝的摆动等（见参考文献[89]和其中的参考文献）。

近场扫描光学显微镜（NSOM）在靠近样品表面创建亚波长光源，用低于衍射极限的横向光学分辨率产生光学图像。光探针是化学蚀刻成圆锥形尖头的锥形光纤和用不透明的金属涂层金属处理并在其顶点留下 20～100nm 的清净孔径。从光纤发出的激发光产生纳米级的激发光源。将尖端保持在细胞表面上方几个纳米距离，位于尖端之下近场的只有荧光分子被激发[90]。因此，除了用于扫描细胞的经典机制外，在扫描过程中还必须保持探针尖与细胞表面的固定距离而使用反馈机制（图 8.9）。人们对这种技术特别感兴趣的是，它可用于研究质膜蛋白或位于接近质膜或与质膜相连的蛋白质[91~93]。

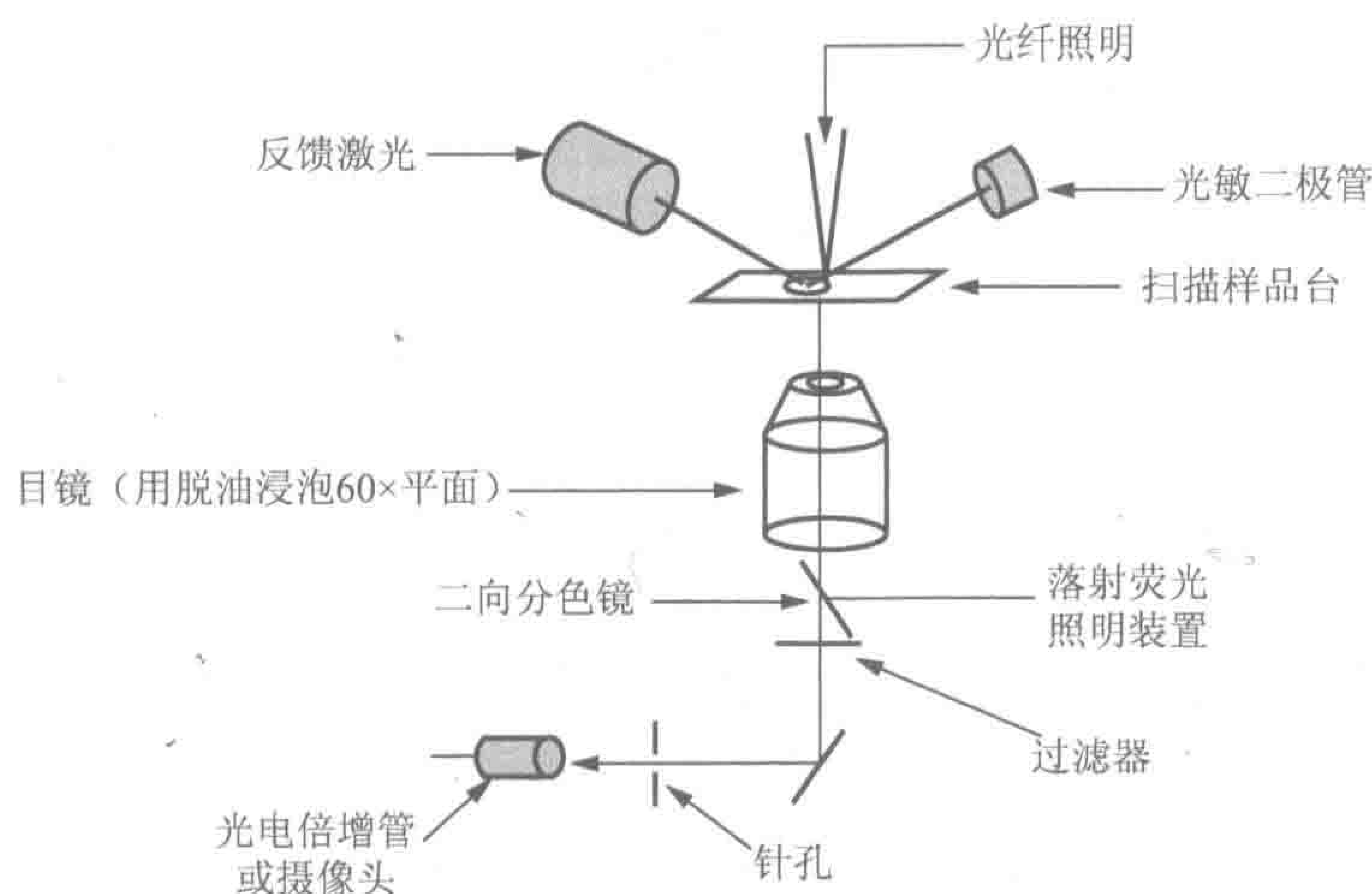


图 8.9　近场扫描光学显微镜示意图。PMT. 光电倍增管

如前面所提到的，多光子显微镜需要两个连贯的光子同时“到达”荧光靶位，所以这种技术只对细胞中小体积提供有效的照射。此外，该技术不限于质膜附近的探索。设备和数据处理的改进已产生 10nm 范围的空间分辨率[93,94]。近场扫描光学显微镜与已经描述的双光子技术优美结合的最佳方式是减少背景信号[85]，并使 spFRET 和 smFPA 能用于完整的活细胞。

除了生物医学领域具有潜在的宝贵资料外，单分子的光学研究还提供了关于这些荧光的光物理过程的动态信息[95,96]。通过辐射粒子数增加的意外持久的“黑暗状态”，已经证明与荧光质子化状态相关。这就是用探索技术诱导生物分子潜在微扰的引人注目的例子。单荧光分子的光学研究，也用于蛋白质折叠途径中，不同的构象与自由能级同值结合构成的分子，产生量子电位差的问题[97]。

毫无疑问，在单分子水平上的荧光显微镜，将给细胞分子生物学动力学带来新的深刻见解。然而，这将需要掌握荧光报道的生物物理和光物理性能方面的完美知识。可以预料，未来完成特定的三维亚结构域研究将会实现这些目标。

参 考 文 献

[1] Palmer, A. G. (1997) III. Probing molecular motion by NMR. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 732–737.

[2] Nicholson, L.K., Kay, L.E., Baldisseri, D.M., Arango, J., Young, P.E., Bax, A., and Torchia, D. A. (1992) Dynamics of methyl groups in proteins as studied by proton-detected ^{13}C-NMR spectroscopy: application to the leucine residues of staphylococcal nuclease. *Biochemistry* 31, 5253–5263.

[3] Wand, A. J., Urbauer, J. L., McEvoy, R. P., and Bieber, R. J. (1996) Internal dynamics of human ubiquitin revealed by ^{13}C-relaxation studies of rand omly fractionally labeled protein. *Biochemistry* 35, 6116–6125.

[4] LeMaster, D. M. (1999) NMR relaxation order parameter analysis of the dynamics of protein side chains. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 1726–1742.

[5] Wang, C. W., Pawley, N. H., and Nicholson, L. K. (2001) The role of backbone motions in ligand binding to the c-Src SH3 domain. *J. Mol. Biol.* 313, 873–887.

[6] Lee, A. L. and Wand, A. J. (2001) Microscopic origins of entropy, heat capacity and the glass transition in proteins.

Nature 411, 501–504.

[7] Wand, A. J. (2001) Dynamic activation of protein function: a view emerging from NMR spectroscopy. *Nat. Struct. Biol.* 8, 926–931.

[8] Kay, L. E. (1998) Protein dynamics from NMR. *Nat. Struct. Biol.* 5, 513–517.

[9] Hoogstraten, C. J., Wank, J. R., and Pardi, A. (2000) Active site dynamics in the lead-dependent ribozyme. *Biochemistry* 39, 9951–9958.

[10] Eisenmesser, E. Z., Bosco, D. A., Akke, M., and Kern, D. (2002) Enzyme dynamics during catalysis. *Science* 295, 1520–1523.

[11] Garcia-Mira, M. M., Sadqi, M., Fischer, N., Sanchez-Ruiz, J. M., and Munoz, V. (2002) Experimental identification of downhill protein folding. *Science* 298, 2191–2194.

[12] Dunham, T. D. and Farrens, D. L. (1999) Conformational changes in rhodopsin. *J. Biol. Chem.* 274, 1683–1690.

[13] Mayor, U., Johnson, C. M., Dagget, V., and Fersht, A. R. (2000) Protein folding and unfolding in microseconds to nanoseconds by experiment and simulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13, 518–13, 522.

[14] Hubbel, W. L., Cafiso, D. S., and Altenbach, C. (2000) Identifying conformational changes with site-directed spin labeling. *Nat. Struct. Biol.* 7, 735–739.

[15] Sanchez, R., Pieper, U., Melo, F., Eswar, N., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Mirkovic, N., and Sali, A. (2000) Protein structure modeling for structural genomics. *Nat. Struct. Biol.* 7, 986–990.

[16] Föster, T. (1965) Delocalized excitation and excitation transfer, in *Modern Quantum Chemistry*, vol. 3 (Sinanoglu, O., ed.), Academic, New York, pp. 93–137.

[17] Stryer, L. (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu. Rev. Biochem.* 47, 819–846.

[18] Lakowicz, J. R. (ed.). (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed., Plenum, New York.

[19] Jurgens, L., Arndt-Jovin, D., Pecht, I., and Jovin, T. M. (1996) Proximity relationships between the type I receptor for Fc epsilon (Fc epsilon RI) and the mast cell function associated antigen (MAFA) studied by donor photobleaching fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Eur. J. Immunol.* 26, 84–91.

[20] Clegg, R. M. (1996) Fluorescence resonance energy transfer, in *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy*, vol. 137, Chemical Analysis Series (Wang, X. F. and Herman, B. eds.), Wiley, New York, pp. 179–251.

[21] König, K. (1999) Multiphoton microscopy in life science. *J. Microsc.*200, 83–104.

[22] Diaspro, A. and Robello, M. (2000) Two-photon excitation of fluorescence for three-dimensional optical imaging of biological structures. *J. Photochem. Photobiol.* 55, 1–8.

[23] Patterson, G. H. and Piston, D. W. (2000) Photobleaching in two-photon excitation microscopy. *Biophys. J.* 78, 2159–2162.

[24] Teruel, M. N. and Meyer, T. (2002) Parallel single-cell monitoring of receptor-triggered membrane translocation of a calcium-sensing protein module. *Science Cytometry* 9, 25–32.

[25] Salmon, J.-M., Vigo, J., and Viallet, P. (1988) Resolution of complex fluorescence spectra recorded on single unpigmented living cells using a computerized method. Cytometry 9, 25–32.

[26] Vigo, J., Yassine, M., Viallet, P., and Salmon, J.-M. (1995) Multiwavelength fluorescence imaging: the prerequisite for the intracellular applications. *J. Trace Microprobe Techniques* 13, 199–207.

[27] Gordon, G. W., Berry, G., Liang, X. H., Levine, B., and Herman, B. (1998) Quan-microscopy. *Biophys. J.* 74, 2702–2713.

[28] Bastiaens, P. I. H. and Squire, A. (1999) Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends Cell Biol.* 9, 48–52.

[29] Emptage, N. J. (2001) Fluorescence imaging in living systems. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1, 521–525.

[30] Wouters, F. S., Verveer, P. J., and BastiaensP. I. H.(2001) Imaging biochemistry inside cells. *Trends Cell Biol.* 11, 203–211.

[31] Dong, C. Y., So, P. T., French, T., and Gratton, E. (1995) Fluorescence lifetime imaging by asynchronous pump-probe microscopy. *Biophys. J.* 69, 2234–2242.

[32] Schneckenburger, H., Gschwend, M. H., Sailer, R., Mock, H. P., and Strauss, W. S. (1998) Time-gated fluorescence

microscopy in cellular and molecular biology. *Cell Mol. Biol.* 44, 795–805.

[33] Schneckenburger, H., Gschwend, M. H., Sailer, R., Strauss, W. S., Lyttek, M., Stock, K., and Zipfl, P. (2000) Time-resolved in situ measurement of mito- chondrial malfunction by energy transfer spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 5, 362–366.

[34] Despa, S., Vecer, J., Steels, P., and Ameloot, M. (2000) Fluorescence lifetime microscopy of the Na^+ indicator sodium green in HeLa cells. *Anal. Biochem.* 281, 159–175.

[35] Jakobs, S., Subramaniam, V., Schönle, A., Jovin, T. M., and Hell, S. W. (2000) EGFP and DsRed expressing cultures of *Escherichia* coli imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. *FEBS Lett.* 479, 131–135.

[36] Squire, A., Verveer, P. J., and Bastiaens, P. I. H. (2000) Multiple frequency fluorescence lifetime imaging microscopy. *J. Microsc.* 197, 136–149.

[37] Tadrous, P. J. (2000) Methods for imaging the structure and function of living tissues and cells: fluorescence lifetime imaging. *J. Pathol.* 191, 229–234.

[38] Hanley, Q. S., Subramaniam, V., Arndt-Jovin, D. J., and Jovin, T. M. (2001) Fluorescence lifetime imaging: multi-point calibration, minimum resolvable differences, and artifact suppression. *Cytometry* 43, 248–260.

[39] Bancel, F., Salmon, J.-M., Vigo, J., and Viallet, P. M. (1992) Microspectro-fluorometry as a tool for investigations of non calcium interactions of indo-1. *Cell Calcium* 13, 59–68.

[40] Vo-Dinh, T. (1978) Multicomponents analysis by synchronous luminescence spectroscopy. *Anal. Chem.* 50, 396–401.

[41] Stevenson, C. L., Johnson, R. W., and Vo-Dinh, T. (1994) Synchronous luminescence: a new detection technique for multiple fluorescent probes used for DNA sequencing. *Biotechniques* 16, 1104–1110.

[42] Viallet, P. M., Vo-Dinh, T., Bunde, T., Ribou, A.-C., Vigo, J., and Salmon, J.-M. (1999) Fluorescent molecular reporter for the 3-D conformation of protein sub-domains: the Mag-indo 1 system. *J. Fluoresc.* 9, 153–161.

[43] Viallet, P. M., Vo-Dinh, T., Ribou, A.-C., Vigo, J., and Salmon, J.-M. (2000) Native fluorescence and Mag-indo-1-protein interaction as tools for probing unfolding and refolding sequences of the bovine serum albumin subdomain in the presence of guanidine hydrochloride. *J. Protein Chem.* 19, 431–439.

[44] Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Predergast, F. G., and Cormier, M. J. (1992) Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229–233.

[45] Ludin, B. and Matus, A. (1998) GFP illuminates the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 8, 72–77.

[46] Bajno, L. and Grinstein, S. (1999) Fluorescent proteins: powerful tools in phagocyte biology. *J. Immun. Methods* 232, 67–75.

[47] Chamberlain, C. and Hahn, K. M. (2000) Watching proteins in the wild: fluorescence methods to study dynamics in living cells. *Traffic* 1, 755–762.

[48] Latif, R. and Graves, P. (2000) Fluorescent probes: Looking backward and looking forward. *Thyroid* 10, 407–412.

[49] Sacchetti, A., Ciccocioppo, R., and Alberti, S. (2000) The molecular determinants of the efficiency of green fluorescent protein mutants. *Histol. Histopathol.* 15, 101–107.

[50] Whitaker, M. (2000) Fluorescent tags of protein function in living cells. *BioEssays* 22, 180–187.

[51] Miyawaki, A. and Tsien, R. Y. (2000) Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. *Methods Enzymol.* 327, 472–500.

[52] Truong, K. and Ikura, M. (2001) The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformation changes in vivo. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 573–578.

[53] Xu, X., Gerald, A. L., Huang, B. C., And erson, D. C., Payan, D. G., and Luo, Y. (1998) Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer. *Nucleic Acid Res.* 26, 2034, 2035.

[54] Mahajan, N. P., Harrison-Shostak, D. C., Michaux, J., and Henman, B. (1999) Novel mutant green fluorescent protein protease substrates reveal the activation of specific caspases during apoptosis. *Chem. Biol.* 6, 401–409.

[55] Jones, J., Heim, R., Hare, E., Stack, J., and Pollok, B. A. (2000) Development and application of a GFP-FRET intracellular caspase assay for drug screening. *J. Biomol. Screen.* 5, 307–318.

[56] Luo, K. Q., Yu, V. C., Pu, Y., and Chang, D. C. (2001) Application of the fluorescence resonance energy transfer

method for studying the dynamics of caspase-3 activation during UV-induced apoptosis in living HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 1054–1060.

[57] Tawa, P., Tam, J., Cassady, R., Nicholson, D. W., and Xanthoudakis, S. (2001) Quantitative analysis of fluorescent caspase substrate cleavage in intact cells and identification of novel inhibitors of apoptosis. *Cell Death Differ.* 8, 30–37.

[58] Ng, T., Squire, A., Hansara, G., et al. (1999) Imaging protein kinase Cα activation in cells. *Science* 283, 2085–2089.

[59] Nagay, Y., Miyazaki, M., Aoki, R., Zama, T., Inouye, S., Hirose, K., Iino, M., and Hagiwara, M. (2000) A fluorescent indicator for visualizing cAMP-induced phos-phorylation in vivo. *Nat. Biotechnol.* 18, 313–318.

[60] Zhang, J., Ma, Y., Taylor, S. S., and Tsien, R. Y. (2001) Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 14, 997–15, 002.

[61] Ting, A. Y., Kain, K. H., Klemke, R. L., and Tsien, R. Y. (2001) Genetically encoded fluorescent reporters of protein tyrosine kinase activities in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 15, 002–15, 008.

[62] Llopis, J., Westin, S., Ricote, M., et al. (2000) Ligand-dependent interactions of coactivators steroid receptor coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor binding protein with nuclear hormone receptors can be imaged in living cells and are required for transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4363–4368.

[63] Kenworthy, A. K., Petranova, N., and Edidin, M. (2000) High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol. Biol. Cell* 11, 1645–1655.

[64] Sorkin, A., McLure, M., Huang, F., and Carter, R. (2000) Interaction of EGF receptor and Grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. *Curr. Biol.* 10, 1395–1398.

[65] Janetopoulos, C., Jin, T., and Devreotes, P. (2001) Receptor-mediated activation of heteromeric G-proteins in living cells. *Science* 291, 2408–2411.

[66] Wilding, M., Török, K., and Whitaker, M. (1995) Activation-dependent and activation-independent localization of calmodulin to the mitotic apparatus during the first cell cycle of the Lytechnius pictus embryo. *Zygote* 3, 219–224.

[67] Wilding, M., Wright, E. M., Patel, R., Ellis-Davies, G., and Whitaker, M. (1996) Local perinuclear calcium signals associated with mitosis-entry in early sea urchin embryos. *J. Cell Biol.* 135, 191–199.

[68] Torok, K., Wilding, E.M., Groigno, L., Patel, R., and Whitaker, M. (1998) Imaging the spatial dynamics of calmodulin activation during mitosis. *Curr. Biol.* 8, 692–699.

[69] Whitaker, M. (2000) Fluorescent tags of protein function in living cells. *Bio Essays* 22, 180–187.

[70] Zimprich, F., Török, K., and Bolsover, S.R. (1995) Nuclear calmodulin responds rapidly to calcium influx at the plasmalemma. *Cell Calcium* 17, 233–238.

[71] Falke, J. J. (2002) A moving story. *Science* 295, 1480, 1481.

[72] Baron, S., Poast, J., Rizzo, D., McFarland, E., and Kieff, E. (2000) Electroporation of antibodies, DNA, and other molecules into cells: a highly efficient method. *J. Immunol. Methods* 242, 115–126.

[73] Zelphati, O., Wang, Y., Kitada, S., Reed, J. C., Felgner, P. L., and Corbeil, J. (2001) Intracellular delivery of proteins with a new lipid-mediated delivery sys- tem. *J. Biol. Chem.* 276, 35, 103–35, 110.

[74] Boyle, D. L., Carman, P., and Takemoto, L. (2002) Translocation of macromolecules into whole rat lenses in culture. *Mol. Vis.* 8, 226–234.

[75] Fortugno, P., Wall, N. R., Giodini, A., O'Connor, D. S., Plescia, J., Padgett, K. M., Tognin, S., Marchisio, P. C., and Altieri, D. C. (2002) Survivin exists in immune-chemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule func- tion. *J. Cell Sci.* 115, 575–585.

[76] Anantharam, V., Kitazawa, M., Wagner, J., Kaul, S., and Kanthasamy, A. G. (2002) Caspase-3-dependent proteolytic cleavage of protein kinase C is essential for oxydative stress-mediated dopaminergic cell death after exposure to methyl- cyclopentadienyl manganese tricarbonyl. *J. Neurosci.* 22, 1738–1751.

[77] Fernand o, P., Kelly, J. F., Balazsi, K., Slack, R. S., and Megeney, L. A. (2002) Caspase 3 activity is required for

skeletal muscle differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 11, 025–11, 030.

[78] Weiss, S. (2000) Measuring conformational dynamics of biomolecules by single molecule fluorescence spectroscopy. *Nat. Struct. Biol.* 7, 724–729.

[79] Ha, T., Ting, A. Y., Liang, J., Caldwell, W. B., Deniz, A. A., Chemla, D. S., Schultz, P. G., and Weiss, S. (1999) Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 893–898.

[80] Deniz, A. A., Laurence, T. A., Beligere, G. S., Dahan, M., Martin, A. B., Chemla, D. S., Dawson, P. E., Schultz, P. G., and Weiss, S. (2000) Single-molecule protein detection protein folding: diffusion fluorescence energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5179–5184.

[81] Byassee, T. A., Chan, W. C. W., and Nie, S. (2000) Probing single molecules in single living cells. *Anal. Chem.* 72, 5606–5611.

[82] Schütz, G.H., Kada, G., Pastuhenko, V.P., and Schindler, H. (2000) Propertiesof lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J.* 19, 892–901.

[83] Harms, G. S., Cognet, L., Lommerse, P. H. M., Blad, G. A., and Schmidt, T. (2001) Autofluorescent proteins in single-molecule research: applications to live cell imaging microscopy. *Biophys J.* 80, 2396–2408.

[84] Harms, G. S., Cognet, L., Lommerse, P. H. M., et al. (2001) Single-molecule imaging of L-type Ca^{2+} channels in live cells. *Biophys. J.* 80, 2639–2646.

[85] Iino, R., Koyama, I., and Kusumi, A. (2001) Single-molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface. *Biophys. J.* 80, 2667–2677.

[86] Sase, I., Miyata, H., Ishiwata, S., and Kinosita, K. Jr. (1997) Axial rotation of sliding actin filaments revealed by single fluorescence imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5646–5650.

[87] Warshaw, D. M., Hayes, E., Gaffney, D., Lauzon, A. M., Wu, J., Kennedy, G., Tribus, K., Lowey, S., and Berger, C. (1998) Myosin conformational states determined by single fluorophore polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8034– 8039.

[88] Adachi, K., Yasuda, R., Noji, H., Itoh, H., Yoshida, M., and Kinosita, K.Jr. (2000) Stepping rotation of F1-ATPase visualized through angle-resolved single-fluorophore imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7243–7247.

[89] Sako, Y. and Uyemura, T. (2002) Total internal reflection fluorescence microscopy for single-molecule imaging in living cells. *Cell Struct. Funct.* 27, 357–365. 90.

[90] Marchese-Ragona, S. P. and Haydon, P. G. (1997) Near-field scanning optical microscopy and near-field confocal optical spectroscopy: emerging techniques in biology, in *Imaging Brain Structure and Function* (Lester, E. D., Felder, C. C., and Lewis, E. N., eds.), Annals of the New York Academy of Sciences, New York, pp. 196–207.

[91] Enderle, T., Ha, T., Ogletree, D. F., Chemla, D. S., Magowan, C., and Weiss, S. (1997) Membrane specific mapping and colocalization of malarial and host skeletal proteins in the plasmodium falciparum infected erythrocyte dual-color near field scanning optical microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 520–525.

[92] Kirsch, A. K., Subramaniam, V., Jenei, A., and Jovin, T. M. (1999) Fluorescence resonance energy transfer detected by scanning near-field microscopy. *J. Microsc.* 194, 448–454.

[93] Korchev, Y. E., Raval, M., Lab, M. J., Gorelik, J., Edwards, C. R., and Rayment- Klenerman, D. (2000) Hybrid scanning ion conductance and scanning near-field optical microscopy for the study of living cells. *Biophys. J.* 78, 2675–2679.

[94] Doyle, R. T., Szulzcewski, M. J., and Haydon, P. G. (2001) Extraction of near-field fluorescence from composite signals to provide high resolution images of glial cells. *Biophys. J.* 80, 2477–2482.

[95] Dickson, R. M., Cubitt, A. E., Tsien, R. Y., and Moerner, W. E. (1997) On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescence protein. *Nature* 388, 355–358.

[96] Petermann, E. J. G., Brasselet, S., and Moerner, W. E. (1999) The fluorescence dynamics of single molecules of green fluorescence protein. *J. Phys. Chem.* A 103, 10, 553–10, 560.

[97] Dill, K. E. (1999) Polymer principles and proteinfolding. *Protein Sci.* 8, 1166–1180.

第9章 生物传感的碳纳米管和纳米线

Jun Li, Hou Tee Ng, Hua Chen

概 述

本章回顾了基于碳纳米管和各种纳米线的纳米技术，在生物传感作用中的最新进展。这些 1D 材料与同维度（纳米级）生物分子相互作用方面显示独一无二的性质。综述了包括合成、材料特性、器件制造、生物功能化及这些材料的生物传感应用等各个方面。这种集成的纳米生物传感器证明，可提供超高灵敏度，响应速度快，高度的多重检测，而且还具有最小采样要求潜力。本章旨在为不同背景，但在纳米生物技术快速发展的跨学科领域，有共同兴趣的人们提供全面的新信息。

关键词：碳纳米管；单壁碳纳米管；多壁碳纳米管；纳米线；化学气相沉积法；光刻技术；自组装；扫描探针显微镜；场效应晶体管；纳米电子学

9.1 导 论

高效生物传感，需要直接询问具有 1～100nm 的物理维度个体的生物分子。但这个领域强烈要求技术和探测工具扩展到类似长度尺度的发展，这是近年来纳米技术主要驱动力之一。随着纳米型材料尺度的减小，它们显示出许多新的电子、光学和力学性质，这些性质能更加直接反映环境和目的样品的关系。虽然大多数原料很少是纳米粒子，但更有吸引力的是高宽比为一维（1D）的材料如碳纳米管（CNT）和各种纳米线（NW）作为制造设备的元件。

最近已经得到公认，纳米管和纳米线作为传感元件及用于检测气体和小分子化合物的生物学应用工具。报道了基于碳纳米管[1,2]和纳米线[3,4]在提高灵敏度、降低检测限制、减少试样量及增加多样品和小型化有希望的结果。尽管这些研究仍处于早期研究阶段，但他们为未来的生物技术发展已经显示出巨大的潜力。本章从技术发展的角度总结，使用碳纳米管和纳米线生物传感器的开发实施的最新进展，我们希望吸引人们在生物医学研究中，探索这种技术潜在应用的兴趣。

碳纳米管属于由具有极高纵横比的无缝石墨圆柱体组成的材料家族[5~8]。典型直径从约 1nm 到几百纳米变化，长度范围从十几纳米到几百微米，甚至到厘米的变化。1991 年日本电器股份有限（NEC）公司的科学家最初发现碳纳米管的圆柱形结构[9]。碳纳米管可以由一层石墨组成，称为单壁碳纳米管（SWCNT）[10]，如图 9.1A 所示，或多层石墨组成，被称为多壁碳纳米管（MWCNT）[9]，如图 9.1B 和图 9.1C 所示。单壁碳纳米管通常直径较小（低到 7Å），并显示出强烈依赖于螺旋性电子特性，即（*m*，*n*）石墨薄板

中的晶格载体，沿着那些晶格载体卷成管状[11]。众所周知，如果他们的手性（m，n）满足 $m-n\neq3\times$整数，那么单壁碳纳米管就是半导体[5~8]。多壁碳纳米管由每个外壳所有可能的螺旋性随机混合组成[12]。

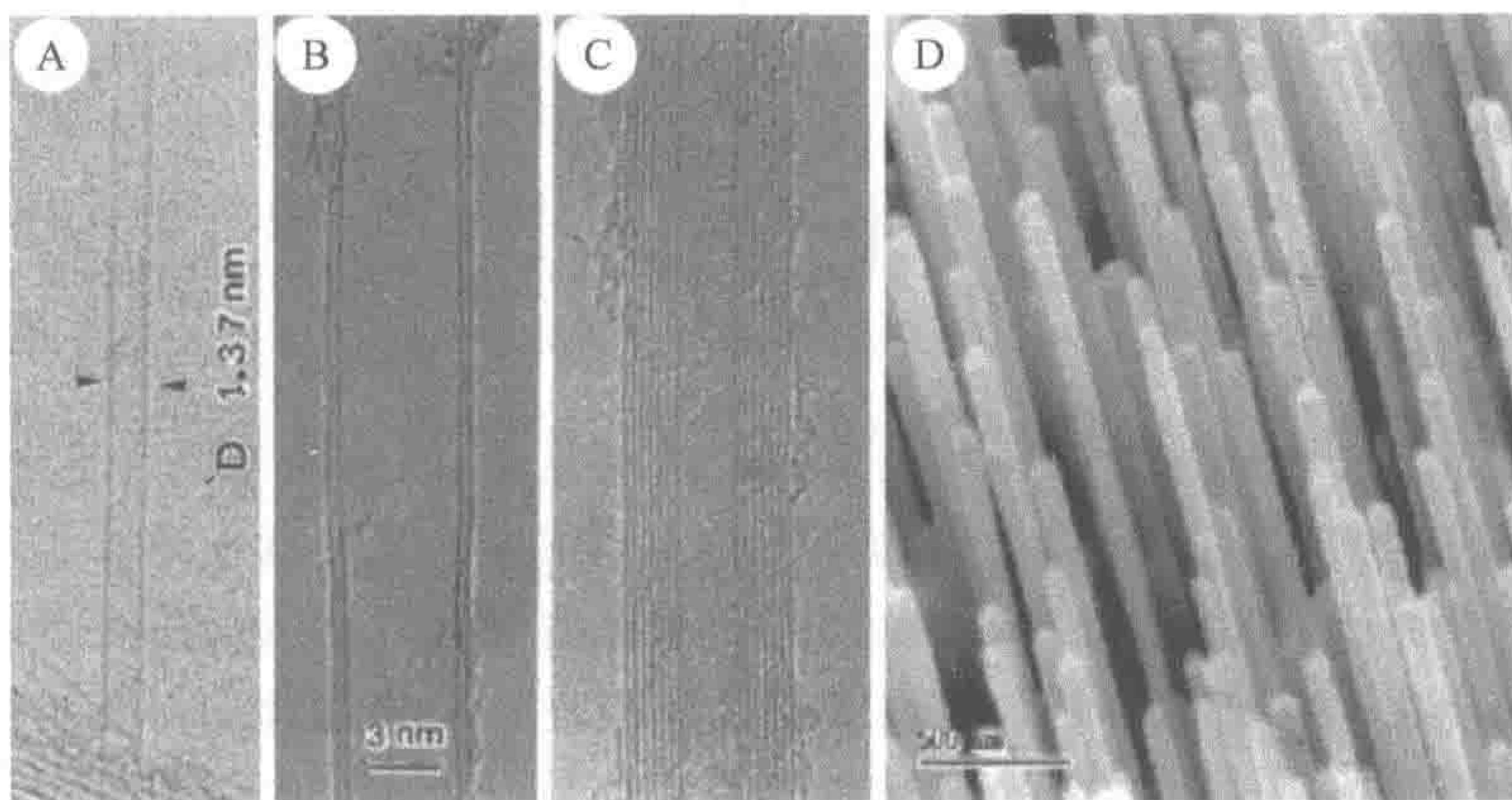


图 9.1　透射电子显微镜（TEM）图像（A）的一个 SWCNT 和（B，C）的两种类型的多壁碳纳米管，以及氧化锌纳米线阵列的（D）的扫描电子显微镜（SEM）图像。图 A 转载自参考文献[10]并征得许可，图 B 和 C 转载自参考文献[9]并征得许可；版权为 1991 年和 1993 年，分别为自然出版集团，http：//www.nature.com）

由于耐人寻味的纳米尺度结构和独特的性能，在过去几年中碳纳米管也很快引起了许多领域强烈的关注，如纳米电子器件[12~20]、复合材料[21]、场发射装置[22,23]、原子力显微镜探针[24~27]和氢/锂离子存储器[28,29]等。许多研究也报道了超高灵敏度的传感器潜力[1,20,30~32]。具有极高的表面与体积比的碳纳米管是理想的高效吸附材料。1D 量子线性质使得他们的电子性质对气体或化学吸附极其敏感。这两个因素都对高灵敏度传感器是必不可少的。在过去的几年中，证明碳纳米管传感器涉及气体分子、液相化学制剂和生物分子等的许多应用，与常规传感器相比，应用微型材料或大分子材料和薄膜[2]都表现出优良的性能。根据用途，可分为用单个自支撑碳纳米管[25,26]、半导电的单壁碳纳米管场效应晶体管（FET）[1,20,33,34]、定义良好的纳米电极阵列[35]或多孔膜[32,36,37]来制造传感设备。

另外，纳米线通常是指高结晶度、线状的一维材料，它们由金属[38]、半导体[3,39]或无机化合物所组成[4,40]。可以用具有高长径比的合成物类似于纳米管方法合成它们，也就是说，可以人工合成几纳米到几百纳米直径和更大微米长度的纳米管。图 9.1D 显示 ZnO 纳米线的良好对齐阵列，具有大约 100nm 和长度大于微米的平均直径。除了显示相似的性质外，碳纳米管、纳米线还具有良好定义的晶体结构，如高长径比和大表面-体积比。各种结晶材料和掺杂方法有很宽的选择，使纳米线的电子和光学特性，具有高度自由度和精确度可调功能。随着新的合成方法的发展，纳米线在传感器中的应用将吸引人们越来越多的关注。

纳米线的另一类型是基于模板方法。这些材料本质上，是由异质的生物学材料和固态纳米材料而不是均匀的结构组装的。纳米/生物装配纳米线组件包括两种方法：①碳纳

米管或结晶纳米线起模板作用，在模板上生物分子聚集成纳米级线状结构[41]；②DNA 或蛋白质的大分子主链或总成起模板作用，在模板上纳米粒子沉积形成纳米线状结构[42]。这两种方法都在生物传感非均相集成纳米生物系统中得到了证实，这种生物传感器结合了生物识别驱动自组织功能，具有期望的固态电子性质。

9.2 材料的生长和设备制造

9.2.1 碳纳米管的生长

一种正在积极进行的研究课题是，寻找具备期望数量和质量的生长碳纳米管解决方案。为了成功合成碳纳米管，无论是传感器应用单壁还是多壁，已经有了大量的探索、改进、修饰的实验方案。所使用的典型技术包括电弧放电、激光烧蚀、化学气相沉积。在大多数的生长过程中，都使用金属或混合合金催化剂。

Iijima 和 Ichihashi [10]及 Bethune 等[43]首先通过使用电弧放电的技术，证明了单壁碳纳米管的生长，尽管数量不多。单壁碳纳米管通常伴随着大量的无定形碳、碳纳米颗粒和其他碳基材料。通过使用激光烧蚀法，Thess 等[44]进一步提高纯度和以克量合成单壁碳纳米管。合成的单壁碳纳米管大多以绳索的形式而存在和由于范德瓦耳斯力相互作用单纳米管聚集成六方晶。为了获得好质量和大量产物，通过其他小组随后的研究，已改良了实验设计或实验构想。例如，Kajiura 等[45]利用最近设计装备了一个过滤区的隔离室，通过控制气体流量，产生了高通量的单壁碳纳米管索。Journet 等[46]将钇和镍合并成碳阳极，优化了单壁碳纳米管的生长。这两种技术也成功地用于合成多壁碳纳米管。

最近，化学气相沉积（CVD）已经得到普及，在同步合成单壁碳纳米管和多壁碳纳米管时具有良好的产率，特别是对于直接生长制造设备。典型的生长过程包括在加热催化剂上通入烃类气体，高温下保持一段时间。Kong 等[47]证明使用这些技术，通过在 850～1000℃的范围内，在氧化铝载体催化剂上通入甲烷来合成高品质单壁碳纳米管。许多研究证明，通过优化催化剂制备和生长条件，纳米管的质量和产量可以进一步得到改善[48~51]。最近，Bronikowski 等[52]展示了用气相 CVD 法大规模生产（10g/h）高纯度 SWCNT，称为 HiPco 过程。以 450mg/h 的速度进行制备纯度高达 97%（摩尔）的单壁碳纳米管材料。

拥有半导体工艺兼容性优点的等离子体增强 CVD（PECVD），为设备制造碳纳米管的生长已引起人们广泛关注[53~55]。单个或阵列碳纳米管可以通过光刻技术精确定义的位点中生长，达到几十纳米[55]。也可以通过一个电场精确地控制纳米的排列。唯一的缺点是，通过等离子增强化学气体沉积生长的碳纳米管有更多的瑕疵，与石墨层与管轴不完全平行。沿管形成许多竹节状包围壳，而不是从一端一直到另一端形成完全中空的通道。然而，发现这种有缺陷的结构，对许多传感器应用[35]没有多大影响。随着生长技术和方法学不断努力的发展，可以预计不久的将来，将获得具有所期望性能、质量和数量的碳纳米管。

9.2.2 结晶纳米线的生长

用金属、半导体或无机化合物可以形成1D结晶纳米线。它们在广泛范围中的应用，包括纳米电子学、纳米传感器及纳米生物技术已经显示了潜力。不同合成策略已经开发了获得所需的1D纳米线，它们可以分为两类：湿化学法和气相法。

Stejny 等[56]对各向异性晶体性质所决定的一维纳米线的生长证明，直径为约 20nm 和数百微米长的聚合（硫氮化物）无机纳米线，可以通过它们高度各向异性结构键合的优势来合成。Golden 等[57]、Venkataraman 和 Lieber[58]采用类似策略分别证明了$(Mo_3Se_3^-)_n$和钼硒化合物分子线的合成。Gates 等[59]应用硒原子沿 *c*-轴包装六角形螺旋链证明，可用于大规模合成叔硒（t-Se）均匀纳米线的一个通用的液相方法。

另一种策略涉及使用模板以协助1D纳米线的合成。该模板作为内（或周围）支架，目的材料可以通过与模板形态互补原位产生。例如，Limmer 等[60]的研究显示，氧化铅（氧化锆、氧化钛）纳米线的多孔氧化铝膜均匀阵列的生长。虽然合成的纳米线通常是多晶体，但可以谨慎选择生长条件获得单晶纳米线。Barbic 等[61]和 Molares 等[62]的实验分别使用电极和脉冲电沉积法证明，单晶银纳米线和单晶铜纳米线的生长。Müller 等[63]研究表明，通过模板对“V”形槽蚀刻成硅（100）衬底的表面，可能制造大阵列的锗纳米线。Sugawara 等[64]进一步证实了可以通过模板对存在 NaCl 晶体表面上的地形特征来获得铁的纳米线的三维（3D）阵列。其他模板方案，包括对存在的纳米结构形成自组织分子结构，也已成功用于获得各种纳米线[65]。

另外，气相合成可能是一维纳米线制造中最广泛的探索方法。通过维持低超饱和水平和低蒸汽压，原则上一维纳米结构可以从块体材料合成。气相法的主要优点在于它的简单性和易用性。在典型的生长过程中，蒸汽种类首先通过蒸发形成，接着通过化学还原、运输和气体与合适的基底缩合。在直接气相法中，Zhang 等[66]通过升高温度加热这些材料的粉末，证明了氮化硅、碳化硅、氧化镓及氧化锌纳米线的成功生长。Yang 和 Lieber [67]采用间接气相法，使用碳热还原过程证明氧化镁纳米线的生长。最近，Shi 等[68]通过使用 Si 和 SiO_2 的混合物原料观察到硅纳米线的生长。激光烧蚀是用来协助这些块状材料气化的。

在给予各种蒸汽的方法中，气-液-固（VLS）机制用于产生具有单晶结构纳米线生长工艺，有望成为最成功的方法。许多研究团体都从各自的无机材料[69~73]中合成了各种纳米线。VLS 机械生长方法的关键组成部分涉及气态反应物溶解成为液体催化纳米粒子，以1D纳米线成核和生长的柔性模板起作用。

1D纳米线合成的主要挑战是，在单个生长过程中如何调整它们的直径、长度和均匀属性。在许多实际应用中尤为重要的是，它们的结构、物理和电子特性需要高度同质性。

9.2.3 纳米生物传感设备

图 9.2 总结了基于纳米管和纳米线四种类型的最普遍使用的生物传感装置，它涵盖了现在文献报道中大部分研究工作。根据传感应用，不同的器件结构和制造路线要求成

功达到期望的功能。总的来说，碳纳米管或纳米线是传感装置的关键元件，其在制造的路径中或直接或间接进行集成。为了打造功能器件，各种各样的方法，从先进的微型或纳米光刻技术到手工制作过程，已通过不同的研究人员所证明。一般来说，碳纳米管/纳米线可以是有生物学事件中发生变化属性的传感元件，或将变化信号转成测量单位的传感器。该感测装置可以使用单个的碳纳米管/纳米线或这类材料集成。

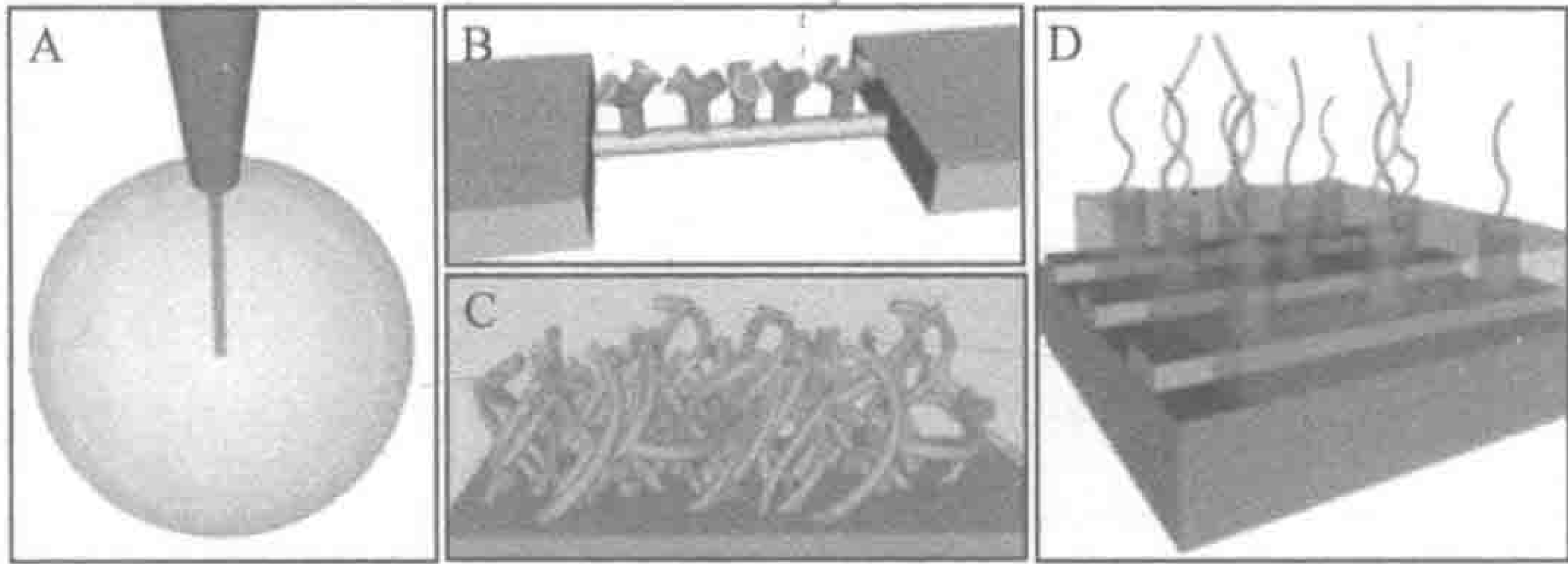


图 9.2 四种类型的 CNT/NW 设备用于生物传感的原理：（A）单 CNT 或 NW 从微尖延伸到探测单个细胞或单分子；（B）使用单个半导电的 CNT 或 NW FET 器件；（C）多孔 CNT/NW 薄膜作为电化学生物传感器；（D）纳米电极阵列为基础的电化学生物传感器

最简单的生物传感采用单个碳纳米管或纳米线来探测单个活细胞的生化环境或查看生物单分子（图 9.2A）。碳纳米管/纳米线探针可以附加到光学检测的光纤拉头上[74]或附加到电子测量或电化学测量的电极上[75]。通常情况下，为了这样的应用，这种仪器的侧壁必须有屏蔽或绝缘，以减少背景信号，这样，可以检测来自探测器尽头的小信号。碳纳米管/纳米线探头提供了最佳的空间分辨率，以及超高灵敏度和短的响应时间。体积小、高长径比、机械性坚固的碳纳米管还作为高分辨率的扫描探针显微镜（SPM）的物理探针。这种技术是阐明低于几个纳米分辨率的单分子（如 DNA 和蛋白质）结构强有力的工具。

使用纳米光刻技术，可将半导体碳纳米管或纳米线用来构造荧光能量转移，如图 9.2B 所示。这种装置包含半导体碳纳米管或与作为栅极电极的氧化覆盖硅基板上两个接触电极（源和漏）连接的纳米线[1,13]。使用半导体如硅制造的常规荧光能量转移，已设定为通过修改栅极氧化（无栅电极），具有分子受体或用于感兴趣分析物的离子选择性膜[76]构成的传感器。带电物质的结合或吸附，在类似于栅极电位的半导体材料内，可能产生耗竭或累积载体的电场。其结果是源电极和漏电极之间的电导明显改变了。基于这样的机制，称为化学场效应晶体管传感器[76]，自 20 世纪 80 年代已有许多应用。

正如我们在本章导论部分提到的，单壁碳纳米管具有良好的定义结构。单壁碳纳米管的螺旋度确定它是金属的还是半导体的。已经证明，半导体单壁碳纳米管（S-SWCNT）场效应晶体管，通过改变施加在硅基板上[1]的栅极电压，就会展现出几个数量级可调电导的 p 型晶体管特性。这样的现象被认为是，由于周围环境中的电子受体对 O_2 吸附的结果。因为每个碳原子是暴露在表面，所以单壁碳纳米管有高效率气体吸附作用。另外，理论上预测，每氧分子的转移约需要 0.1 电子[77]。由于尺寸小，这就为将极大地改变 FET 电子行为的“块状”单壁碳纳米管提供大的载波密度。单壁碳纳米管的量子线的性质使得该管的电导更加敏感，因为任何偏点电荷沿 1D 导线本地载波会完全耗尽。因此，单

分子吸附/解吸附的灵敏度，原则上能获得这样小型半导体半壁碳纳米管荧光能量转移（S-SWCNT FET）。半导体纳米线（S-NW）如 Si [3]和 In_2O_3[4]最近在 FET 的传感设备也获得了验证。这样的生物传感设备的应用将在 9.3.2 节中进行讨论。

大的表面-体积比和沿管轴良好的电导系数，使得纳米管对于基于酶的电化学传感器具有吸引力。碳纳米管可作为常规电极上的薄膜[78~80]或用作三维多孔膜（图 9.2C）[32,36,37]。如天然碳纳米管 CNT 集成，作为大型固定化基底和递送体，从而提高酶的活性部位和电化学传感器之间的电子转移。提高烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADH）[80]、神经递质[32]和酶[79]的电化学行为已有报道。

碳纳米管/纳米线器件的最后类型，也是基于在二氧化硅基质嵌入的，如图 9.2D 所示，垂直对齐的碳纳米管的电化学传感器。电化学信号是分析物还原/氧化（氧化还原）反应的表征，而不是通过 FET 感测的非特异性电荷，产生非常良好的特异性类似于当今生物学研究常用的荧光光学技术。另外，使用单独解决微电极阵列与微电子和微流体系统结合的分子诊断，实现高度小型化和多重检测[81~84]，这比光学技术更具有吸引力，尤其是用于快速和简单的诊断。然而，使用传统的宏观电极和微电极的电化学技术灵敏度，要比光学技术灵敏度低几个数量级，这限制了它们在许多应用中的使用。纳米传感元件已经主动追踪、探索电化学技术的灵敏度改善的解决方案。

具有速度和已知的空间分辨率的电极性能，与电极半径成反比[85~87]。生物传感的兴趣在于将电极的半径减少到 10～100nm，接近生物分子的大小。Li 等[35]证明纳米电极，特别是多壁碳纳米管（MWCNT）纳米电极阵列，平均直径为 30～100nm，可以集成为用于超灵敏的化学和 DNA 检测的电化学系统。纳米电极阵列被制造为具有自下而上的方案，产生精确定位和在平坦化的 SiO_2 矩阵中，嵌入良好对齐的多壁碳纳米管阵列[55,88]。在硅基板覆盖的金属膜上使用直流（DC）热丝等离子体化学气相成积法（CVD），使垂直排列的多壁碳纳米管首先生长。然后，发生硅酸四乙氧基酯 CVD 的二氧化硅的间隙填充。发现单个多壁碳纳米管之间的间隙，统一填满了二氧化硅绝缘体，从而加强了多壁碳纳米管阵列。随后除去过量的 SiO_2，通过机械抛光步骤，使多壁碳纳米管尖端暴露。多壁碳纳米管的开口端，露出于电介质表面充当纳米电极。如图 9.3 所示，生长在用光刻技术限定不同密度的多路复用微电极上的，碳纳米管阵列扫描电子显微镜图像。包埋和平面化阵列的表面只显示，暴露纳米管最末端作为良好界定的纳米电极。这样的纳米电极阵列，无论是在本体溶液还是固定在碳纳米管末端的氧化还原，都显示纳米管电化学行为特征。已观察到，灵敏度和时间常数都有显著改善[35]。

碳纳米管在纳米电极的应用中表现出许多优点。宽电极电位窗口，灵活的表面化学和生物兼容性，使多壁碳纳米管阵列这一吸引人的电极类似于其他广泛使用的碳电极。多壁碳纳米管的开口端预计，将显示快速的电子传递速率（ETR），类似于石墨边缘面内电极，而侧壁是惰性的如石墨基面[89]。沿管轴的快速电子传递已得到证实[75,90]。这样的多壁碳纳米管电极，可以询问低于单分子水平的靶物，在末端并维持电子沿管轴，以最小环境干扰输送到测量电路。单个纳米电极有提供期望的时间和空间的优势，纳米电极阵列服务于可靠统计数据和多重检测分析的需要。

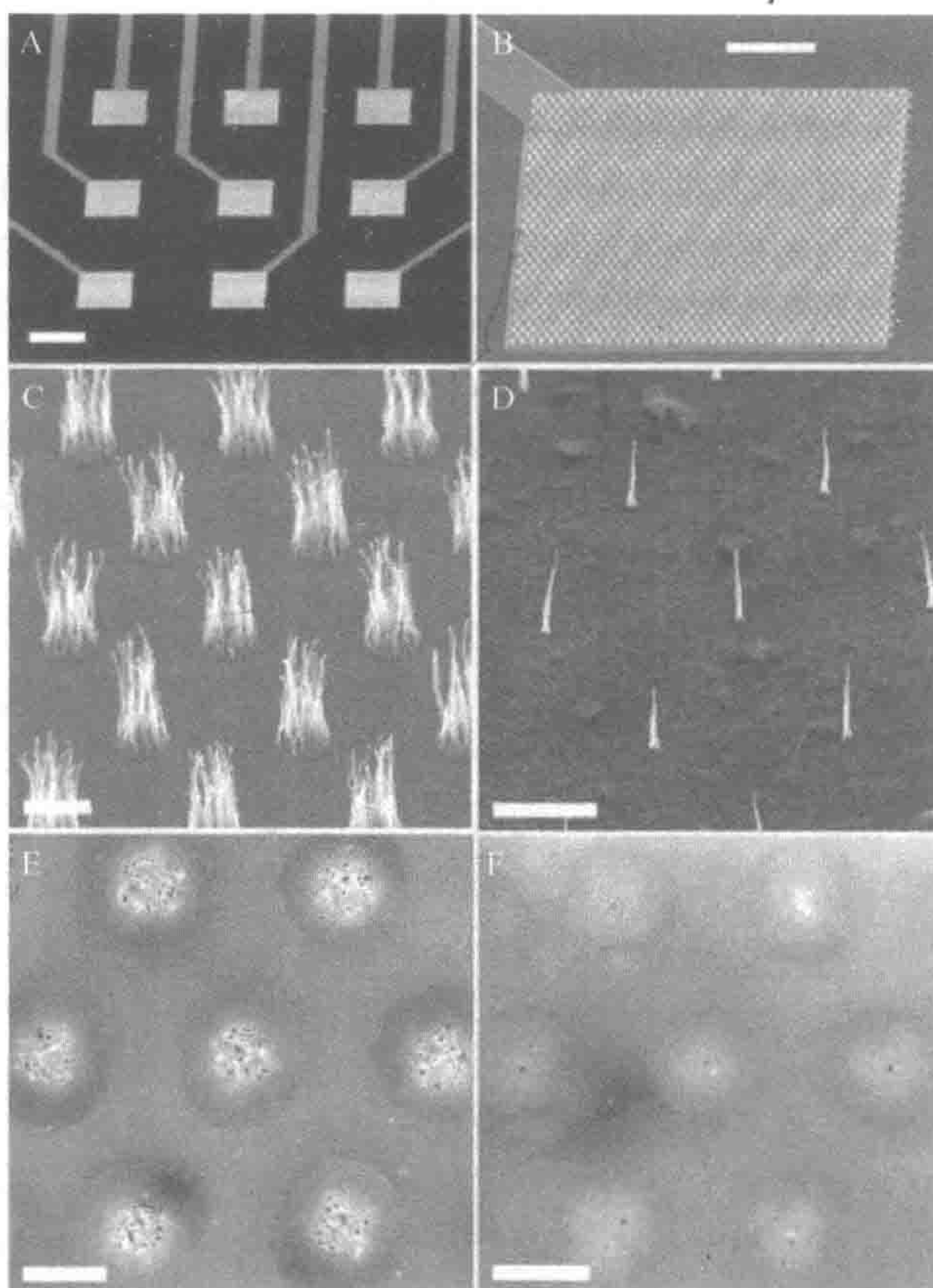


图 9.3　扫描电子显微镜图像（A）3×3 电极阵列；（B）在微电极衬垫上多壁碳纳米管束阵列；（C，D）分别为多壁碳纳米管阵列的紫外线光刻和镍点电子束图案；（E，F）抛光的多壁碳纳米管阵列电极分别在 2μm 和 100nm 斑点表面生长。图 A～D 为 45° 透视，图 E 和 F 为俯视图。白色比例尺分别为 200μm、50μm、2μm、5μm、2μm 和 2μm

9.2.4　生物传感碳纳米管/纳米线的功能化

用于生物感测的共同特征是，有特定功能生物分子固定化于传感装置的要求。在测试样品中，这些生物分子作为探针与特定种类特异性结合，或特异性催化分析物的反应。产生化学或物理性质变化的情况，可以由传感器转换成可测量的信号。靶分子的特异性识别是生物感测的基本特征。常见的探针和靶（分析物）的识别机制包括：①抗体-抗原的相互作用；②核酸杂交；③酶反应；④细胞相互作用。不同功能化的方法，必须适用于设备及其感应机制。我们将官能方法分为三类，以涵盖在 9.3 节概述的所有生物传感方法。这就是：①与碳纳米管的开口端共价结合；②与碳纳米管的侧壁非共价结合；③与纳米线共价结合。

从结构上看，碳纳米管非常类似于石墨片材的辊。侧壁具有类似于石墨基底面非常惰性的化学性质。另外，碳纳米管的开口端类似于石墨端面，由于悬空 sp^2 键而有更多的反应性。为了用碳纳米管扫描探针显微镜（SPM）的探头针尖，测量单分子或单细胞

表面的化学力，以及用碳纳米管纳米电极进行生物传感[35]，碳纳米管的开口端需要官能化。Lieber 等[25,91]研究证明，单壁碳纳米管的开口端，有丰富的—COOH 基团，因此，可用伯胺分子通过 *N*-羟基偶联剂，有时辅以二环己基碳二亚胺，促进酰胺键选择性共价键合。Williams 等[92]用类似的方法，用拥有 NH_2-Glu-GTGCTCATGGTG-$CONH_2$ 序列的肽核酸（PNA），将单壁纳米管的开口端功能化，其中 Glu 是谷氨酸的氨基酸残基和核酸碱基的中心成分。美国国家航空航天局（NASA）研究小组研究表明，DNA 寡核苷酸探针伯胺末端，可以与用水溶性偶联剂 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐和 *N*-硫代羟基琥珀酰亚胺偶联的类似碳亚胺化学将嵌入二氧化硅基质中的垂直排列取向的多壁碳纳米管开口端进行共价功能化[93]。

对于荧光能量转移传感器来说，必须对碳纳米管的侧壁官能化[33,34,94,95]。因为半导体单壁碳纳米管用作导电通道，其电子特性监测结合在表面的带电靶分子，必须保存石墨 sp^2 侧壁结构以维持它的继承属性。这种侧壁结构是强疏水性和化学惰性，这就产生了生物相容性和生物功能化的特异性识别问题。据报道，链霉亲和素和水溶蛋白 HupR 的蛋白质可以大概通过芳香族碳纳米管表面和蛋白质疏水区疏水相互作用，强烈吸附到多壁碳纳米管表面[41]。发现设计的两性分子α-螺旋多肽，在水溶液中通过螺旋疏水面，与碳纳米管表面非共价互作，能自发地装配到单壁碳纳米管表面，亲水性氨基酸侧链从外表面延伸到外面[96]。Chen 等[94]报道，用羟基琥珀酰亚胺酯 1-芘丁酸共轭芘基的π 堆积功能化单壁碳纳米管，将不同蛋白质固定化于该单壁碳纳米管上，而实现非共价侧壁功能化计划。琥珀酰亚胺酯基与蛋白质赖氨酸残基上的氨基反应，形成共价酰胺键[94]。然而，所有基于这类非共价相互作用的固定化方法缺乏特异性；尤其是蛋白质对碳纳米管，直接非特异性结合必然抑制生物传感。使用常规的方法，大量清洗也不足以消除这种非特异性结合蛋白质。为此，表面活性剂（Triton-X 100）与聚乙二醇（PEG）可辅助吸附到碳纳米管表面[95]。发现这种包被层能有效地抵抗链霉亲和素的非特异性吸附。用聚乙二醇进行氨基封端，所以，生物素一半可以添加到 PEG 链通过共价键与活性氨基生物素试剂，即生物素氨基己酸-3-磺酸基-*N*-羟基琥珀酰亚胺酯结合[95]。证明官能化的碳纳米管，对链霉亲和素有特异性识别作用。类似方法已有报道，用混合的聚乙烯亚胺（PEI）和聚乙二醇涂层对荧光能量转移传感器设备上的单壁碳纳米侧壁进行生物素功能化[34]。这些方法可以推广到基于抗体-抗原和互补 DNA 链的特异性互作的其他生物分子的识别。

除了在 FET 传感装置的应用外，碳纳米管也显示很多更好的溶解性，以便可进一步应用于化学或生物化学研究。此外，生物识别可用于调节组装的超分子结构，可能会产生新的传感装置。由于碳纳米管结构的完整性不像在 FET 中一样重要，共价键侧壁功能化也被人们积极追逐，通过将功能基直接附着到石墨表面，如氟化和加氢或在缺位上使用羧酸形成酰胺或酯键[97]。这种侧壁功能化，特别适用于多壁碳纳米管传感器，其碳纳米管只能作为来自实测分子信号传感的探针材料，他们本身的电子性能对环境不敏感。例如，多壁碳纳米管电极，官能抗体或酶可作为一个单一的电化学探针来研究单细胞的生物化学[75]。多壁碳纳米管阵列侧壁功能化，还可以大大提高酶（葡萄糖氧化酶）在电化学葡萄糖传感器中的加载量[37]。最近报道了使用碳纳米管浇铸玻璃碳电极酶传感器的一些研究表明，即使自发吸附或聚合物包埋也可以改善酶的加载和电子转移[78~80]。来自于生物方面的最近报道，肽与碳纳米管选择性亲和力，可能产生生物纳米一体化的新

方法[98]。

用于金属纳米线，如金、银和铜，强烈化学吸附硫醇分子，通常作为固定生物分子的连接物[99]。Si 或 Ge 纳米线在表面上呈现出薄（1～2nm 厚）的天然氧化膜。这种纳米线和其他纳米线氧化物表面存在大量的羟基。用各种硅烷分子与官能化的生物分子连接[100,101]。聚合物包裹也应用于各种官能纳米线，还使用非特异性吸附。Cui 等[3]简单地将硅纳米线浸入到氨基己酰生物素（biotinamidocaproyl）标记的牛血清白蛋白中，接着用磷酸盐缓冲液冲洗，并证明用 FET 设备检测到低于至少皮摩尔浓度范围的链霉亲和素靶特异性结合。

9.3　生物传感的应用和机制

9.3.1　单细胞/单分子探针

碳纳米管/纳米线生物感测的最直接的应用是，作为单个探针使用它们，它们提供很大的空间分辨率。这样的探针由于尺寸小，可以插入到单个细胞，以最小的干扰和超灵敏度进行原位测量。Vo-Dinh 等研究证明[74]，抗体纳米生物传感器，通过简单地将光纤拉成纳米尺寸的尖端测定苯并[a]芘四醇（BPT），即一种人的致癌物质苯并[a]芘的生物标志物。通过硅烷连接的抗 BPT 抗体共价包被顶部。纳米生物传感器插入到单个细胞，保温 5min，让抗原-抗体结合，然后取出探测器。这些光纤的纳米传感器的小尺寸针头，产生的几个优点超过常规探针，包括减少了响应时间和增加了灵敏度。装在荧光分光光度计上的纳米生物传感器灵敏度显示，可测定低于约 1.0×10^{-10}mol/L 的苯并[a]芘四醇[74,102]，检测的绝对极限约为 300 个超痕量（zeptomol，10^{-21}mol）苯并[a]芘四醇[103]。

随着最近碳纳米管和纳米线的发展，这样的线状纳米材料可能适于类似技术。特别是发现沿轴方向有纳米铸造性质的氧化锌纳米线[40,104]，可以用于光学生物分子检测研究。另外，碳纳米管或金属纳米线，可作为测量单细胞电化学反应[75]，或单个分子的反应性的纳米电极。使用纳米电极，电信号有达到单个分子灵敏度的潜力[87]。

连接到扫描探针显微镜探头单个碳纳米管，由于它们直径小、高长径比、大的杨氏弹性模量和机械强度的优点，而引起了人们广泛的兴趣[24]。它们可用作物理探针，在大分子或细胞表面的结构研究中获得最高分辨率。Li 等[26]研究证明，该方法用于实现和表征，结合在扫描探针显微镜（SPM）的碳纳米管，在缓冲溶液内云母表面上 DNA 分子的原位成像。他们使用了一种磁驱动摆动探针的原子力显微镜，用大约 1kHz 频率驱动氮化硅悬臂（k=0.1 的弹簧常数）。用丙烯酸类黏合剂将多壁碳纳米管束附着到锥体尖端。束的直径范围从几十到几百纳米。通常情况下，单一的多壁碳纳米管伸出并用作 SPM 成像探针。λDNA 分子自发地与 2μg/ml 溶液中存在的大约 1mmol/L 氯化镁结合到表面，进而增强 DNA/云母的相互作用。图 9.4 显示 2.3μm×2.3μm 区域的 DNA 分子中的 SPM 图像，它清晰显示了单个 DNA 分子。DNA 图像分辨率非常均匀，并与该碳纳米管尖端（约 5nm）的直径相一致。SWCNT 可以提供更高的分辨率[25,91]。在未来，使用多壁碳纳米管

针头的扫描探针显微镜技术可以解决 DNA 的双螺旋结构问题。端头也可以官能化，以提供有关化学力的其他信息[25,91]。

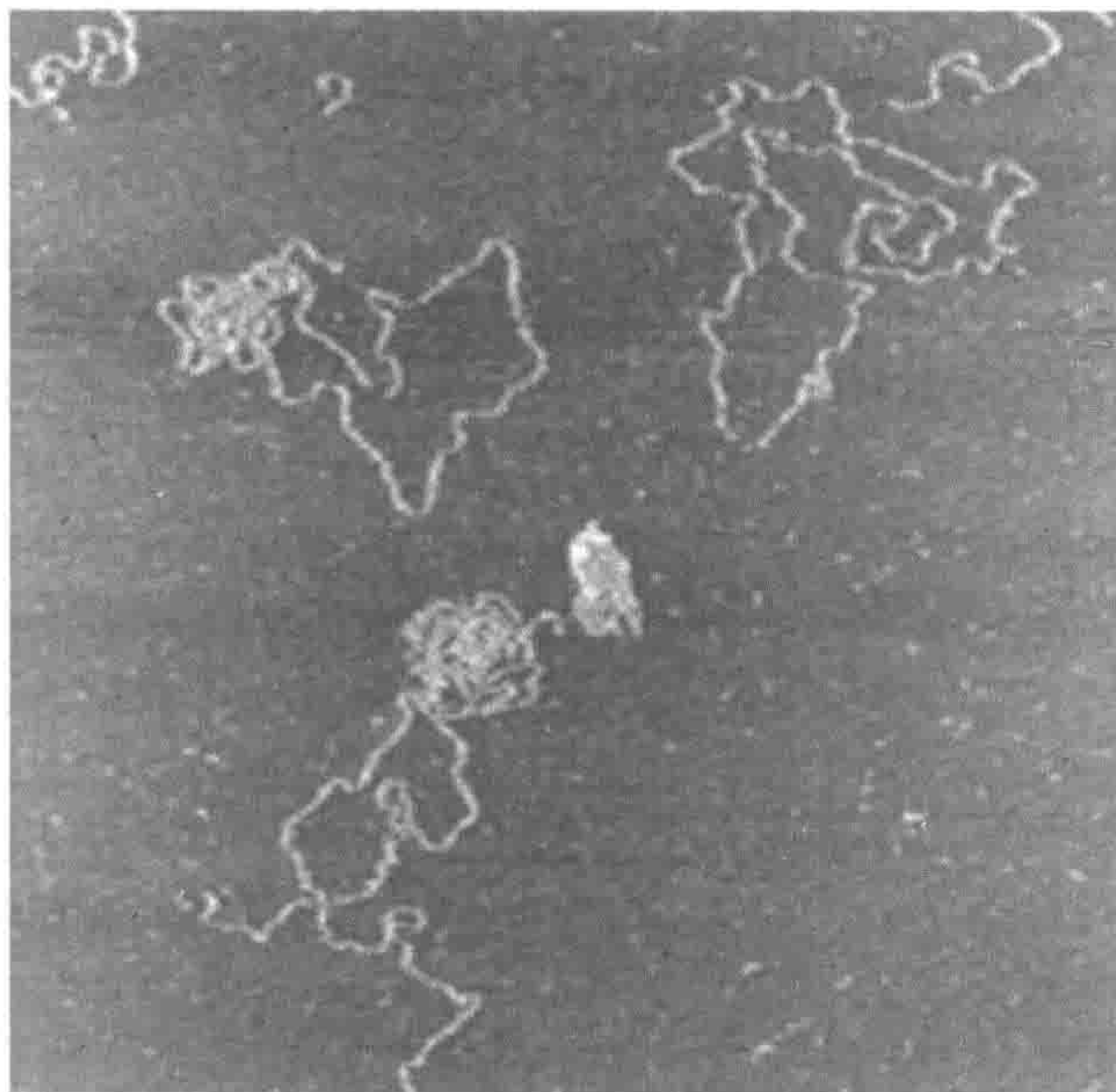


图 9.4　浸没在含单个多壁碳纳米管端头获得的 1mmol/L 的氯化镁缓冲液中的 2.3μm×2.3μm 云母表面上 DNA 分子的 SPM 图像（彩图请扫封底二维码）

Woolley 等[105]报道了采用 SWCNT SPM 探头，千碱基大小的 DNA 直接形成单模。单模的主题——与每个同源染色体相关的特异性等位基因，是单核苷酸多态性（SNP）作图的关键因素，即对常见疾病，如癌症和心脏病的遗传贡献有更深理解。然而，目前用于确定单倍型的方法有显著局限性，阻碍它们在大规模遗传筛查的使用。例如，确定单模的分子技术，如等位基因特异性或单分子聚合酶链反应（PCR）等，由于需要优化，严格的反应条件和潜在显著错误率受到限制。使用具有高分辨率的 SWCNT 探针的扫描探针显微镜，可直接通过与 100～10 000 个碱基的模板 DNA 片段，进行特异性杂交标记寡核苷酸，使多个多态位点直接可视化。证明了在 M13mp18 中链霉亲和素和 IRD800 存在于两个序列的标签位置。拥有半径小于 3nm 和大约 10 个碱基的分辨率的单壁碳纳米管的端口，使得标签之间，如链霉亲和素和基于它们的大小的荧光 IRD800，进行高分辨率多重检测区分成为可能。这个概念已进一步应用到 *UGT1A7* 基因[105]上单倍型的确定，这就是正在研究其在癌症流行病学中的作用。使用单壁碳纳米管的 SPM 探针直接单倍型分析，表现出显著优于常规方法，和可方便用于 SNP 的遗传性疾病和遗传风险[106]相关联和连锁研究。

过去几年中，由于其潜在的单分子传感的潜力，生物分子的电子性质如 DNA 已得到了广泛研究。然而，发现 DNA 分子不导电即使双链形式也是如此。也很难组装成可靠的设备。Williams 等[92]报道了一对单壁碳纳米管与 PNA 共价结合的研究（不带电荷的 DNA 类似物）。在室温条件下使用原子力显微镜测定 DNA 片段与肽核酸（PNA）序列的杂交表明，很少附着于侧壁的单壁碳纳米管开口端，功能化是专一性的。因为化学和

生物学稳定性所以选择 PNA。不带电荷的 PNA 主链产生了 PNA-DNA 双链，因为没有静电排斥，该双链的热稳定性，比它们的 DNA-DNA 对应物热稳定性更高。该方法结合了具有 DNA 特定分子识别功能的 SWCNT 独特性能，它为通过基于识别组装及生物传感，将 SWCNT 掺入大型电子设备上提供了新途径。

9.3.2 荧光能量转换生物传感器

使用 S-单壁碳纳米管[1]和 S-纳米线[4]制作的荧光能量转换用于检测气体分子如 NH_3、O_2 和 NO_2 等显示出超高灵敏度。人工高密度传感器阵列的高灵敏度和潜力使纳米级 FET 非常诱人。相同的原理可以扩展到生物传感，特别是由于生物分子如 DNA 和蛋白质，在大多数情况下大量充电。S-SWCNT FET 结合带电物质，比化学吸附气体分子更敏感。然而，涉及各种离子和其他生物分子的湿化学环境，比操作气敏复杂得多。到目前为止，还没有在液体环境中直接测量生物分子，在 S-SWCNT FET 上结合的成功证明。只有 Star 等[34]最近的一项研究证明，通过在温育和洗涤后的干燥条件下，测量特异性结合生物素-链霉亲和素装置结构的有效性。PEI/PEG 聚合物包被已用来避免非特异性结合。生物素分子连接到聚合物层作为特定的分子识别。通过改变设备的表征，检测生物素-链霉亲和素的结合。在没有聚合物涂层设备中，观察到非特异性结合，而发现有聚合物包衣，但没有生物素化的设备不能结合。在生物素结合位点被过量的生物反应所封闭的链霉亲和素，生物素化聚合物包埋设备的特性基本上没有产生变化。

除了在液体中获得直接测量有困难外，S-SWCNT FET 传感器还要面临 SWCNT 的性质问题，无论是半导体还是金属单壁碳纳米管的特性，用当前的合成方法都不可控。在大范围内，产生的不同性质的碳纳米管混合体，造成了系统研究的困难。半导体如硅和氧化铟的纳米线没有这个限制，因为它们一直是半导体，可以控制掺杂剂的种类和浓度。其结果是，在没有外部栅极的情况下灵敏度可以调谐。

生物识别探针对硅烷交联剂氧化物表面的官能化也更趋成熟。Cui 等[3]成功地证实，掺硼（p 型）硅纳米线的 FET，基于缓冲液中生物和化学物质，可以用来创建高度敏感的实时电子传感器。用 3-氨基丙基三乙氧基硅烷修饰的天然氧化物表面硅纳米线，表现出 pH 电导依赖，它们在大动态范围是线性的，在质子化和去质子化过程中应理解为表面电荷的变化。生物素修饰硅纳米线，用于测定低于至少皮摩尔浓度范围的链霉亲和素。如图 9.5B 所示，在含有 10mmol/L NaCl 的 1mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH 9.0）中，加入 250nmol/L 的链霉亲和素的情况下，生物素修饰的硅纳米线电导，几乎立即增加到恒定值（从区域 1 到区域 2）。打开开关，纯缓冲液（区域 3）流入后，保持这些电导值，表明带负电的物质与 p 型硅纳米线表面不可逆结合，与生物素-链霉亲和素小的解离常数（K_d 约 10^{-15}mol/L）相一致。与此相反，加入①具有未修饰的硅纳米线的链霉亲和素（图 9.5C）溶液，②加入链霉亲和素溶液，其中被 4 当量的 d-生物素与生物素修饰的硅纳米线（图 9.5D）反应，阻断了生物素结合位点，表明在任一情况下，链霉亲和素没有非特异性结合。当链霉亲和素浓度降低至 25pmol/L 时（图 9.5E）（约 10pmol/L 可能是检测极限），观察到生物素-链霉亲和素结合的类似电导变化。此外，生物素官能化的硅纳米线显示，正电荷抗体（单克隆抗生素）可逆特异性结合的电导降低。浓度依赖性检测证实，

实时下降到几微摩尔的浓度。最后，用钙调蛋白修饰硅纳米线，证明了代谢指示剂钙的可逆性结合检测。小尺度、高可靠性及这些半导体纳米线的 FET，对于化学和生物物质敏感、无标记和广泛的实时检测的能力，对分子诊断有巨大潜力。

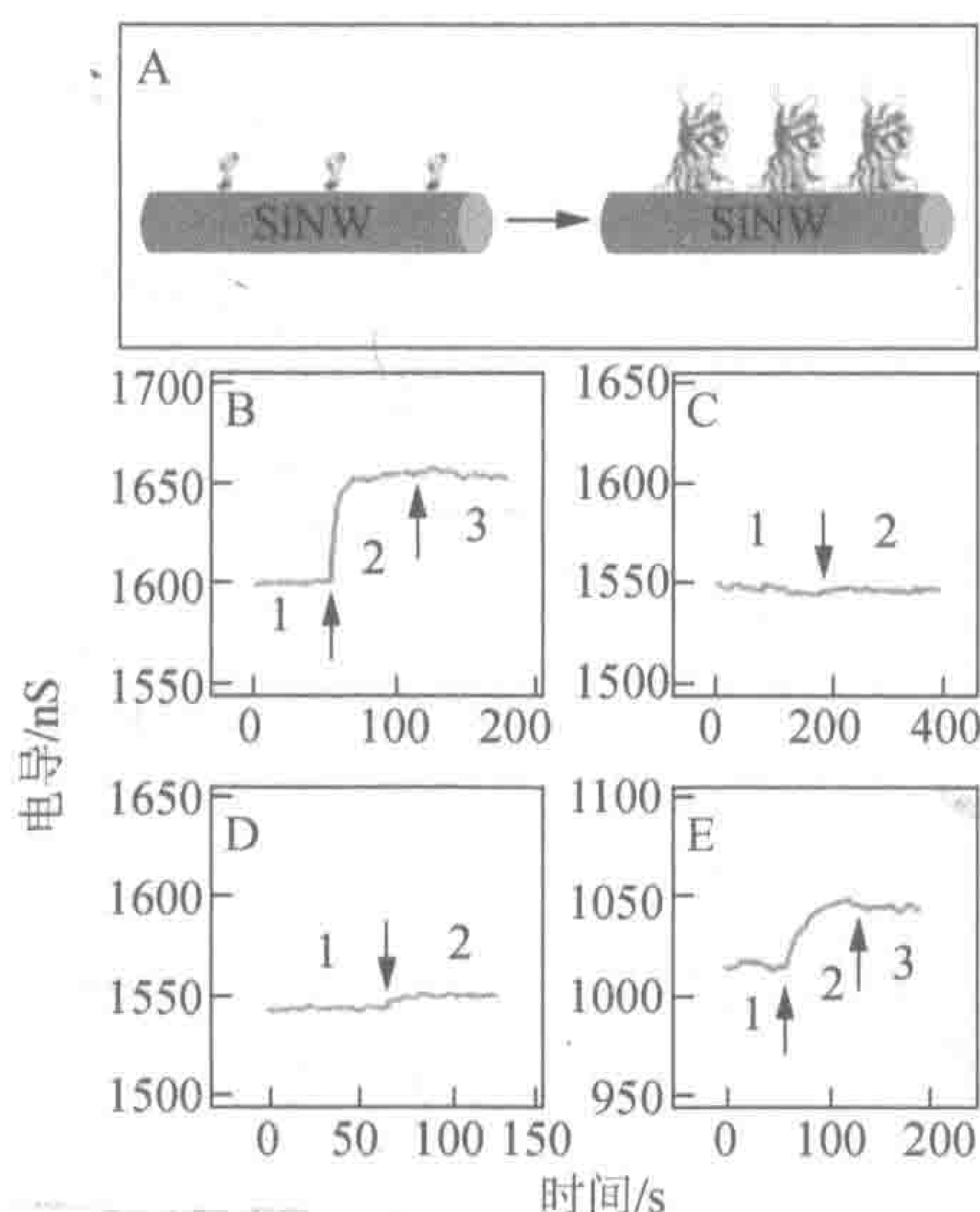


图 9.5　(A) 生物素修饰的硅纳米线 FET 中的设备（左）与链霉亲和素（右）结合后的原理图。(B) 生物素改性的硅纳米线电导对时间的图表，其中区域 1 对应于缓冲液，区域 2 对应于加入 250nmol/L 链霉亲和素，区域 3 对应于纯缓冲液。(C) 未修饰硅纳米线电导对时间；区域 1 和区域 2 与 (B) 中相同。(D) 生物素修饰的硅纳米线电导对时间，其中，区域 1 对应于缓冲液，区域 2 为加入用 4 当量 d-生物素预培养的 250nmol/L 链霉亲和素溶液。(E) 生物素修饰的硅纳米线电导对时间，其中区域 1 对应于缓冲液，区域 2 对应于加入 25pmol/L 链霉亲和素和区域 3 对应于纯缓冲液。箭头标示溶液变化时的点（转载自参考文献[3]并征得许可；版权为 2001 年美国科学促进协会）

9.3.3　基于阵列电化学生物传感器纳米电极

嵌入式碳纳米管阵列最小化背景来自侧壁，而暴露在开口端良好定义的石墨化学，允许采用的寡核苷酸探针氨基端，通过酰胺键对—COOH 基团选择性官能化。碳的宽电极电位窗口，使得它可以直接测量，固定在电极表面的鸟嘌呤碱基氧化信号。使用[Cy3 标记]5′-CTIIATTTCICAIITCCT-3′[AmC7-Q]探针和[Cy5 标记]5′-AGGACCTGCGAAATCCAGGGGGGGGGGG-3′靶，这与野生型（Arg1443 终止子）*BRCA1* 基因相关[107]。10bp 的 polyG 附着于靶序列作为信号部分和在探针中的鸟嘌呤碱用肌苷置换，以确保鸟嘌呤信号只有来自于靶 DNA。将 X3 柠檬酸钠（SSC）缓冲液中约 100nmol/L 的靶溶液 40℃杂交约 1h。分别用含有 0.1%十二烷基磺酸钠的 X3 SSC、X2 SSC 和 X1 SSC，40℃下分别严格洗涤 15min，在每个探针官能化和靶杂交过程之后，去除掉非特异性结合的 DNA 分子，关键是获取可靠电化学数据。

这样的固态纳米电极阵列，在稳定性和加工可靠性方面，具有很大的优势，超过有机小分子自组织混合的，单层电化学 DNA 传感器的优势。用光刻技术可以精确地控制

纳米电极的密度，反过来，可定义探针分子的数量。通过降低纳米电极密度，可以优化测定极限。然而，通过电极与分析物之间转移电子量定义电化学信号，只有它超过背景水平才能观察到结果。特别是，在碳氧化和水电解产生高背景和高电位条件下，以相当高的电位（约 1.05V 对饱和甘汞电极[SCE]）出现鸟嘌呤氧化反应。这个问题可以通过引入吡啶钌 $Ru(bpy)_3^{2+}$介导的，基于电子催化机制放大[108]其信号来解决。碳纳米管电极阵列与吡啶钌 $Ru(bpy)_3^{2+}$介导的鸟嘌呤的氧化方法（图 9.6）结合，Li 等[35]证明，小于几渺摩尔（attomole=10^{-18}mol/L，译者注）寡核苷酸靶杂交可以用一个 20μm×20μm 的电极容易地检测到，与基于 DNA 检测的前电化学方法相比，灵敏度具有数量级的改进。

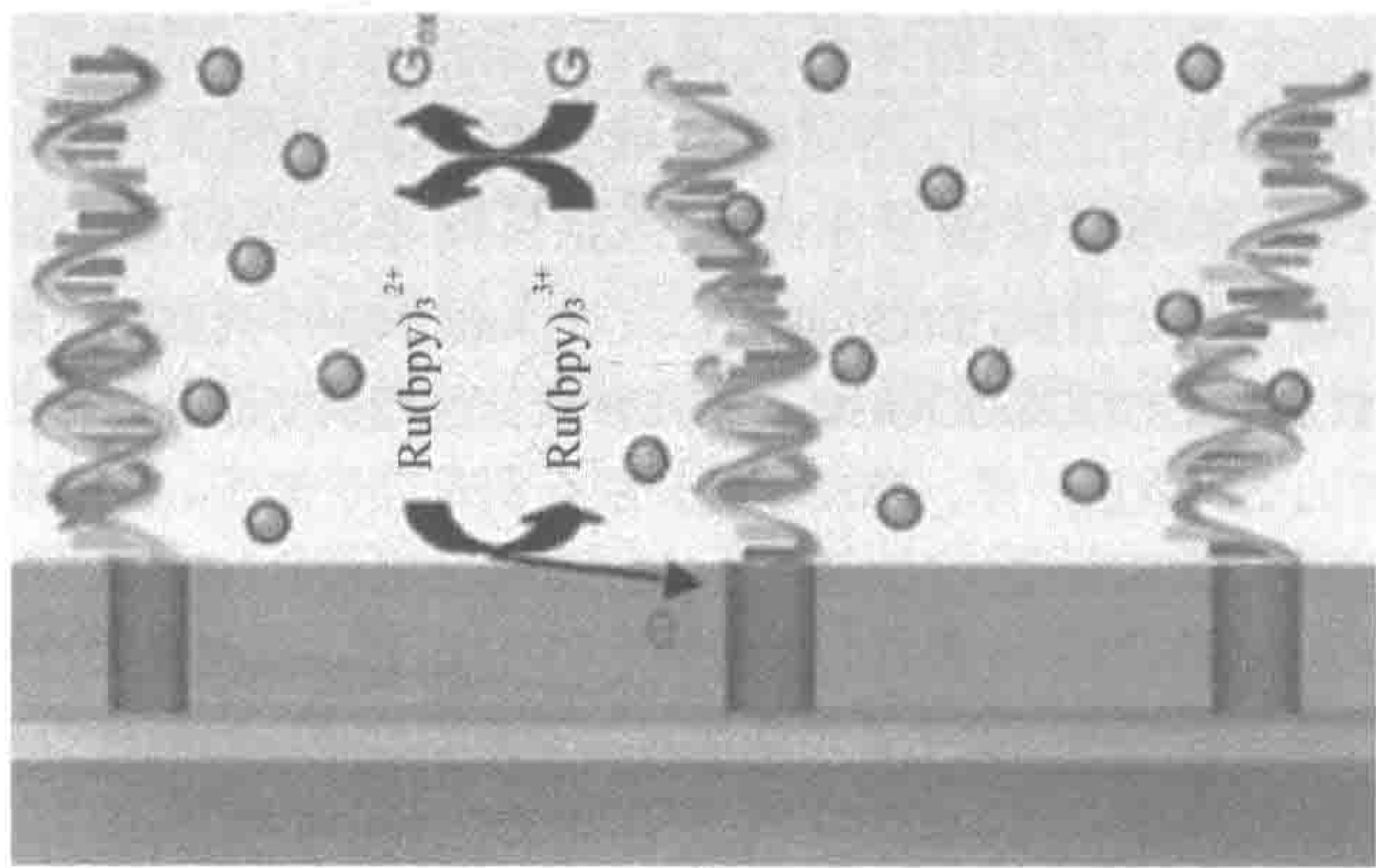


图 9.6　多壁碳纳米管阵列纳米电极与吡啶钌 $Ru(bpy)_3^{2+}$-介导的抗氧化鸟嘌呤的超灵敏检测 DNA 的原理（彩图请扫封底二维码）

图 9.7A 显示：多壁碳纳米管阵列电极上的 polyG 标记 BRCA1 靶（平均值管-管间距约 1.5μm）杂交后，对 0.20mol/L 乙酸钠缓冲液中含 5mmol/L 吡啶钌 $Ru(bpy)_3^{2+}$三个连续交流电流（ACV）扫描。通过施加 10Hz 频率正弦波和 25mV 振幅梯度电位斜坡测量交流电流。因为第一次扫描明显高于几乎重叠后续扫描，可观察到良好定义峰值 1.04V 左右。背景几乎是扁平线为零。如图 9.7B 所示，从第一次扫描值减去第二次扫描出现定义明确的正峰（实线），而从第二次减去第三次扫描出现一个小的负峰（虚线），作为明确的阴性对照。高质量数据表明，仍有足够的空间来降低靶 DNA 的检测极限。在实际诊断中，靶 DNA 是由几百个鸟嘌呤组成主动信号的基础，而发出高得多的信号。因此，该检测最低限可以降低到远低于 1 渺摩尔（attomol）。最近证实，用这个平台对 PCR 产物成功进行了电化学检测。电化学检测的其他优点，如使用电场施加额外严格控制的能力，用本系统完全可能实现。

纳米电极阵列平台，还可以扩展到其他的电极材料，如金和铂纳米线。不同官能化方案和信号部分，必须采取纳米电极的空间和时间分辨率的优势，用于不同实践中。该平台也适用于基于酶的生物传感器，或用于电化学基于病原体检测，通过将蛋白质如酶和抗体固定在电极上而检测病原菌的电化学。

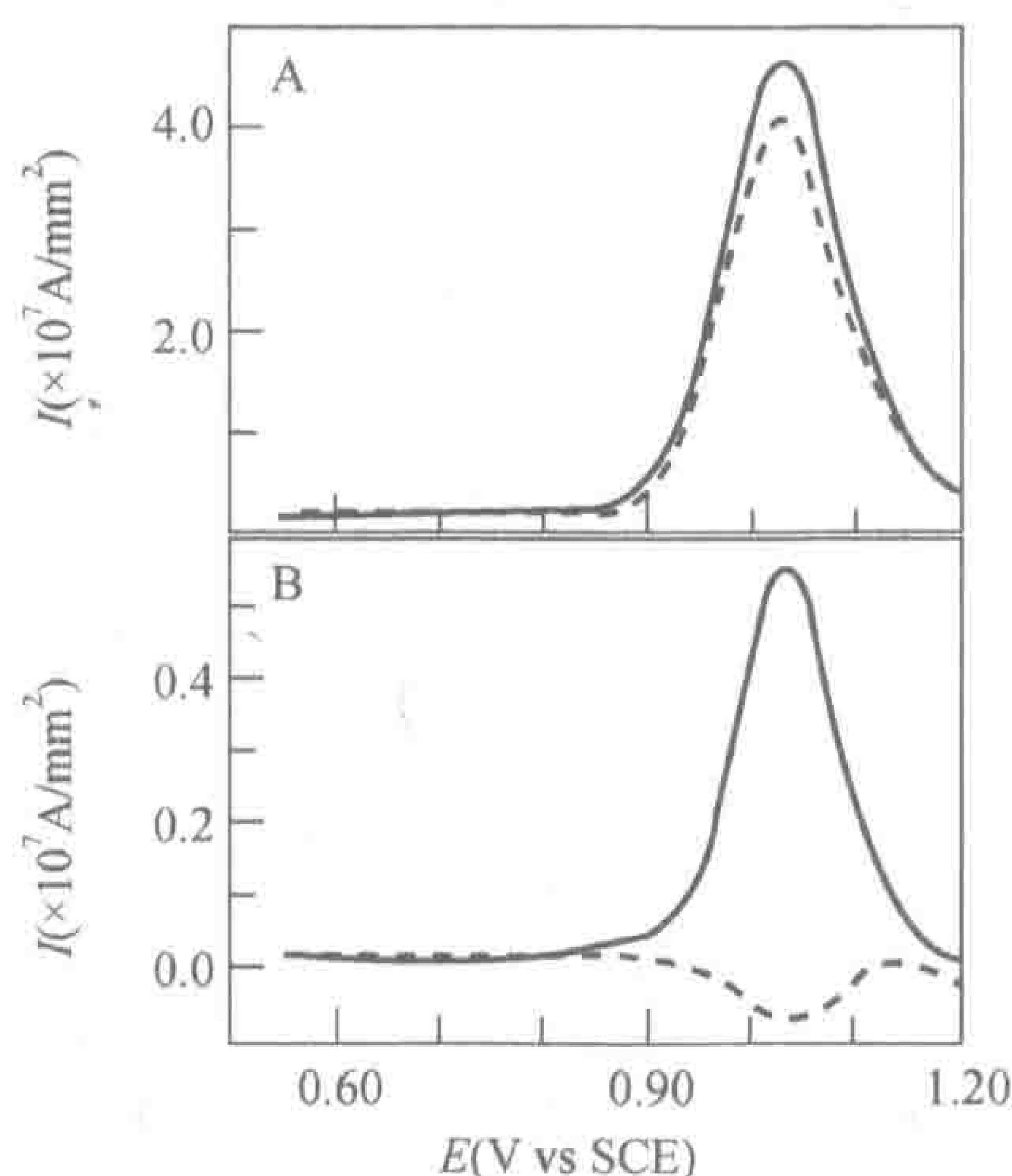


图 9.7 （A）用[Cy3 标记]5′-CTIIATTTCICAIITCCT-3′[AmC7-Q]序列寡核苷酸探针和[Cy5 标记]5′-AGGACCTGCGAAATCCAGGGGGGGGGGG-3′序列寡核苷酸靶杂交而功能化的低密度多壁碳纳米管阵列电极连续三次测得的交流电压。厚、薄和虚线分别分别对应于第一、第二和第三次扫描。用 10Hz 交流正弦波和梯度直流斜坡顶部为 25mV 振幅在 5mmol/L 吡啶钌在 0.20mol/L 的乙酸钠支持电解质（pH 为 4.8）进行测定。（B）分别为第一次和第二次扫描之间（实线），以及第二次和第三次扫描（虚线）之间的差异。由于在表面上的鸟嘌呤碱基，正峰值对应于吡啶钌增加的氧化信号。负峰表示对照组裸电极行为

9.3.4 碳纳米管多孔薄膜电极

除了用作定义明确的设备构件外，单壁碳纳米管和多壁碳纳米管二者均可以转换为常规的电极[78~80]，或用作三维多孔膜的薄膜[32,36,37]。碳纳米管既成为大型固定化材料，也作为提高酶的活性位点和电化学传感器之间的电子转移的介质。修饰碳纳米管玻碳电极，表现出大量（490mV）减少β烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化的过电位。各种酶，如葡糖氧化酶和黄素腺嘌呤二核苷酸，可以自发地吸附到碳纳米管表面，并保持底物特异性的酶活性，超过延长的时间周期[78]。可以开发为基于催化重要生物氧化还原反应（如葡萄糖氧化）的酶生物传感器。

9.3.5 碳纳米管/碳纳米线生物自组装模板

人们非常感兴趣的是用生物大分子，如寡核苷酸[109]、蛋白质[41,94]和肽[96]来修饰碳纳米管或纳米线的外表面。这种生物纳米自组织可以促进新的生物传感器和生物电子纳米材料的开发，这就有了特异性生物分子识别性能与键合大分子相关的优势。为此目的，特异性识别功能，必须稠密地包被于碳纳米管/碳纳米线的外表面，同时生物分子如蛋白质必须保持功能。蛋白质功能特性保持的标准是是否有形成有序阵列的能力。

Balavoine 等[41]报道了链霉亲和素在碳纳米管上，自组装形成螺旋结晶的研究。链霉亲和素由于对(+)生物素具有亲和力（K_a 约 10^{15}），而对许多生化分析如标记和亲和层析非常有用。自组装是在溶液中通过自发吸附来完成的。通过电弧放电法并存储在（约 2mg/ml）甲醇悬浮液中，制备多壁碳纳米管。用乙烷气流干燥 100μl 多壁碳纳米管悬浮

液，然后重悬于 20ml 40%甲醇水溶液中。用超声处理悬浮液，以分散之前在含 10mmol/L Tris（pH 8.0）和 50mmol/L NaCl 的缓冲液中，加入 20μl 链霉亲和素溶液（约 10μg/ml）的多壁碳纳米管，然后将其静置在室温 45min。这样的样品，就沉积在碳薄膜覆盖的网格，并用 2%乙酸双氧铀溶液，为投射电子显微镜成像进行负染。在适当条件下，大概由于疏水性结构域的相互作用，发现多壁碳纳米管的表面几乎被链霉亲和素完全覆盖。尽管大多数自组装是无序的，但在合适的条件下，仍可观察到一些有序空间螺旋结构。对另一种水溶性蛋白质 HupR 也进行了研究，碳纳米管比链霉亲和素在更广范围内表现出有序阵列。

还特别设计了一个 29 残基的两性α-螺旋肽包被和可溶解的碳纳米管，并通过肽-肽间的互作，给碳纳米管上肽包被大分子结构的自组装对照[96]。图 9.8 显示，分子结构截面图和单壁碳纳米管表面，自组装模型的螺旋骨架透视图。6 个这样的α-螺旋足以包围单个的单壁碳纳米管的周围，同时保持典型螺旋间的相互作用。用非极性的氨基酸侧链（缬氨酸和苯丙氨酸）螺旋的疏水面可能与碳纳米管的芳香族表面进行相互作用，并且通过带电荷肽-肽间的互作向外延伸亲水性面，而促进自组装。电子显微镜和偏振光拉曼研究表明，肽包被碳纳米管组装成，沿纤维轴与碳纳米管排列的纤维。可以通过改变肽-肽相互作用的溶液条件，控制纤维的尺寸和形态。

基于非特异性吸附的上述研究，Wang 等[98]使用噬菌体展示技术，鉴定了肽与碳纳米管选择性亲和力。通过纳米管直接附着到噬菌体和游离肽固定到微球上，证实了结合特异性。共有结合序列在特定位置显示，富含组氨酸和色氨酸。肽的构象分析表明，该结合序列是柔性的，并折叠成匹配碳纳米管的几何结构。肽链的疏水结构表明，它们充当对称表面活性剂作用。IgG 单克隆抗体对富勒烯 C_{60}[10]（俗称足球烯）的研究，也显示以某些选择性与碳纳米管结合[111]。

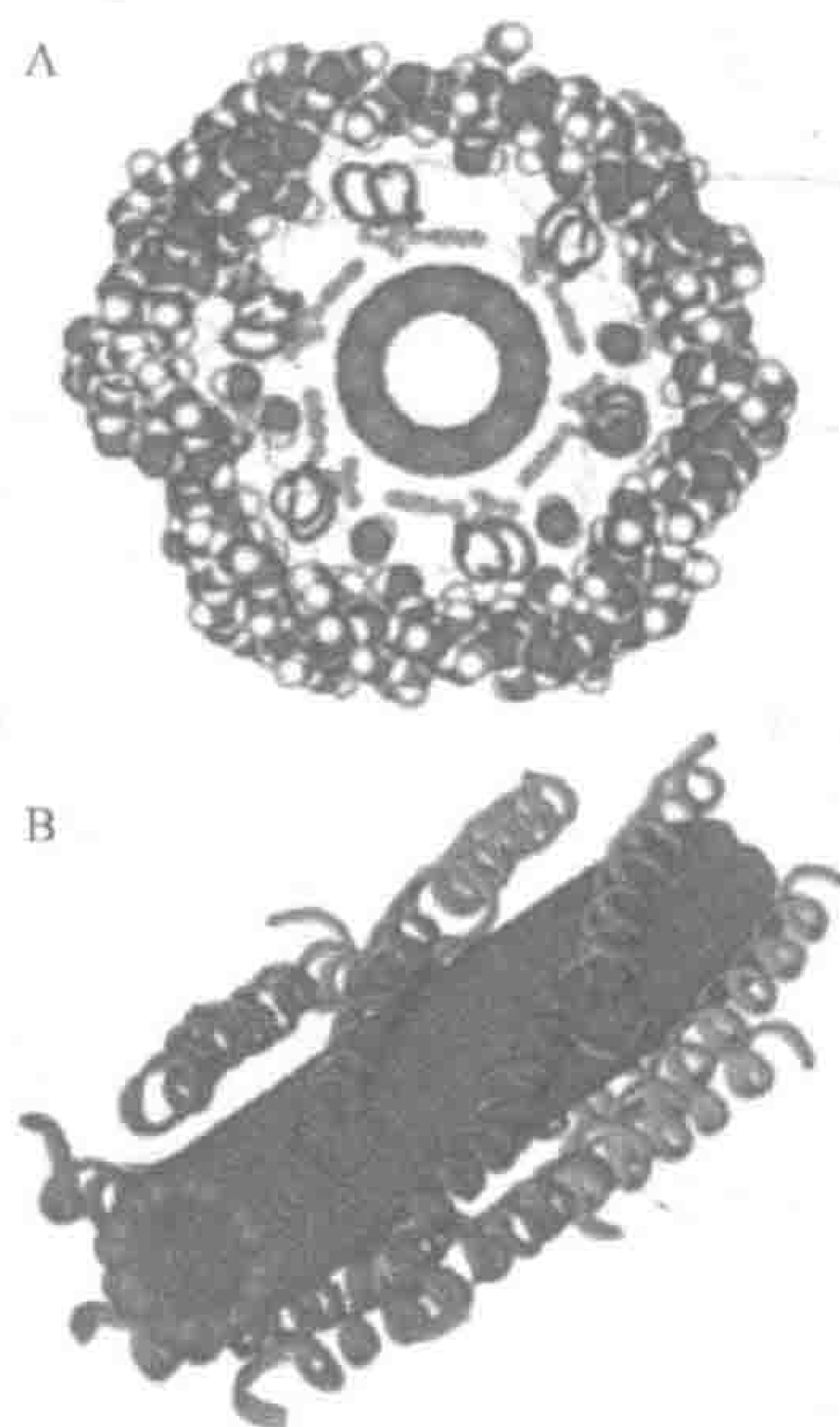


图 9.8　单壁碳纳米管表面组装的两性肽螺旋模型。（A）横截面视图显示缠绕在一个单壁碳纳米管周围的 6 肽螺旋。螺旋带表示每个肽的主链。疏水缬氨酸和苯丙氨酸侧链包埋在单壁碳纳米管表面。5Å 厚的水膜用于能量细化。（B）12 肽螺旋包裹的单壁碳纳米管视图。头-尾排列形成两层肽（转载自参考文献[96]并征得许可；2003 美国化学学会版权所有）（彩图请扫封底二维码）

9.3.6 纳米线组装的生物分子模板

在电子工业中，朝着越来越小组件方向的平稳态势前进，刺激了非传统的“倒置”制造技术的发展，常规的微光刻和纳米光刻，有望成为极其昂贵的未来接近光刻极限的电子电路[112]。倒置的方法，即通常利用生物分子依靠自组装（或自组织）提供可行的解决方案。较低的制造成本和低于光刻电流极限的特征尺寸是倒置方法的两个主要优点。生物分子也可作为沉积各种固体材料，形成非均质纳米线的模板，这样的模板有可能应用于电子生物传感器中。

已研究，在 DNA 上金属如银[42]、金[113]、铂[114,115]、钯[116,117]、铜[118]及官能化的金颗粒[119,120]的化学沉积，可作为创建传导纳米线潜在方法。生物分子的分子识别能特性明显增强纳米结构电路，并且通过金属线在生物模板上，定向结构安装电子功能。Saxl[112]和 Keren 等[113]研究表明，模板 DNA 不仅能构建金和银纳米线，而且 DNA 分子的特定区域，可以受到通过与 DNA 部分相关联的，蛋白质金属沉淀的保护。控制金属化的能力，在空间上提供了朝向功能纳米电路倒置装配的一个重要步骤。然而，有时以小偏差电压观察到不导电间隙。Richter 等[117]报道，钯纳米线在 DNA 模板上的化学沉积，显示高导电欧姆运输行为。图 9.9 显示，单体钯金属化 DNA 链的扫描电子显微镜低电压（1kV）的图像，具有大约 16μm，相当于纵向的 48 502bp 的线性 λDNA 分子的长度。该 DNA 分子被定位宏观的金电极与之后两步的化学沉积方法金属化之间，包括:①用钯（Ⅱ）复合物处理与 DNA 链的一部分结合使模板激活，②随后的复合物还原形成金属簇。这类纳米线 I～V 曲线两端呈现，偏电压下降到 1μV 的线性曲线[117]。发现直径大于 50nm 的纳米线特异性导电，只低于堆积钯幅度一个数量级。

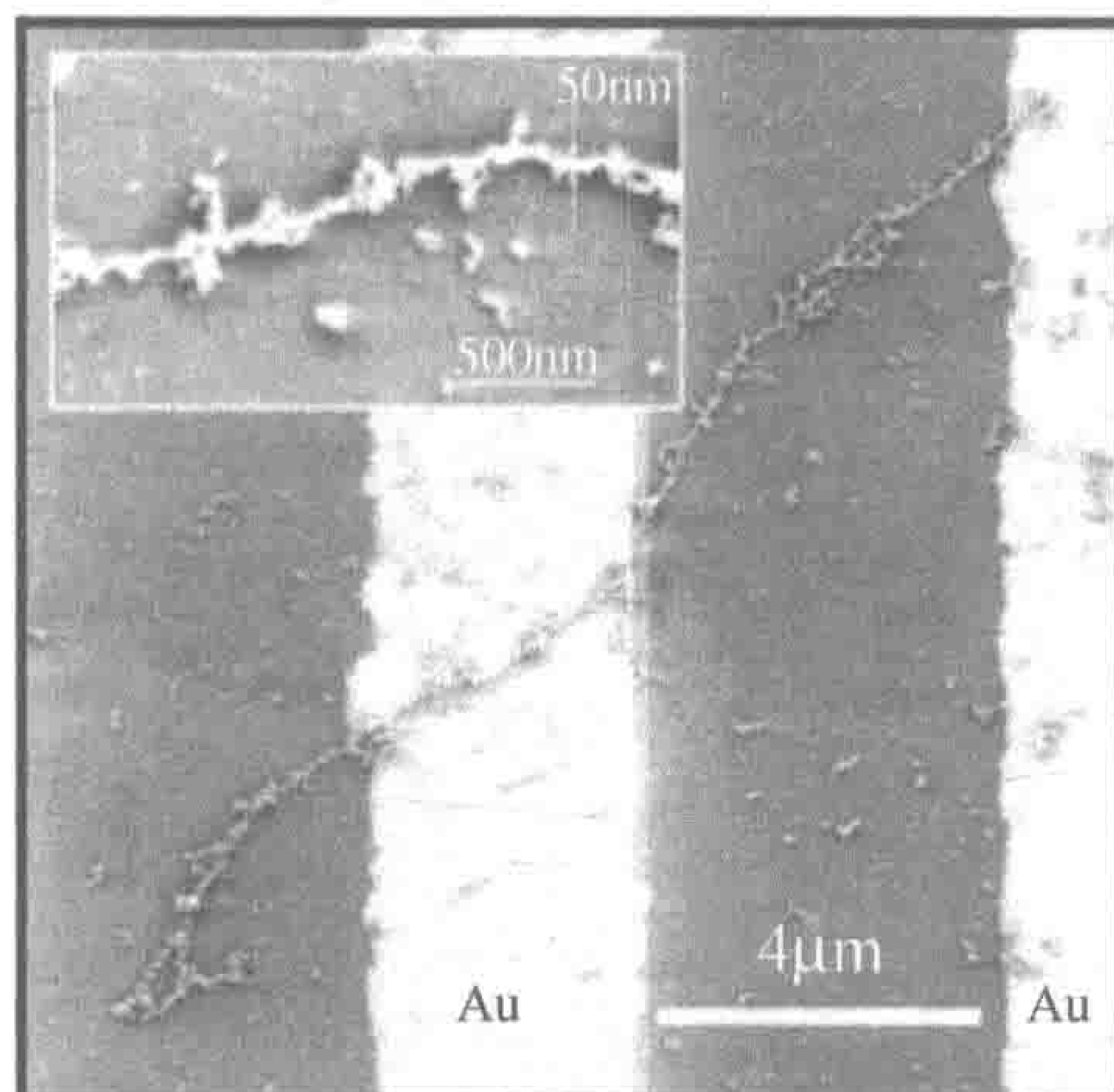


图 9.9　相当于 λDNA 分子长度的 16μm 长度单个钯金属化 DNA 链扫描电子显微镜图像。在链上沉淀的两个金电极测量跨越链的电性能。图中插图显示具有 50nm 直径中间部分的一个放大倍数（转载自参考文献[117]并征得许可；美国物理研究所 2001 年版权）

最近，肽的特异性序列用于矿化特异性金属和半导体，以产生形成非均匀纳米线组件的高度结晶纳米晶体。一个很好的例子是 Djalali 等[121]开发了一种新的生物方法，即

使用富含组氨酸肽序列作为模板来制作金纳米线。已知含组氨酸的肽，对通过组氨酸金属复合物改变蛋白质的构象成异常形式，中枢神经系统的金属离子有高亲和力，而这些畸形蛋白质构型，能引起帕金森病和阿尔茨海默病。含富含组氨酸肽的人工合成涉及 4 个步骤。第一，将双(*N*-α-酰氨基甘氨酰甘氨酸)-1,7-庚烷二羧酸分子（10mmol/L）在 pH 5.5 的柠檬酸/NaOH 溶液中自组装成纳米线。这样的纳米线包含有生物分子如 DNA 或蛋白质有高亲和力的结合位点。第二，把序列为 A-H-H-A-H-H-A-A-D 富含组氨酸的肽固定于庚烷二羧酸盐纳米线结合位点上。第三，将富含组氨酸的肽纳米线与 $ClAuPMe_3$ 溶液混合并温育 5 天，以便将金离子完全固定。第四，加入硼氢化钠还原剂产生金纳米晶体。使用这种方法，高密度覆盖组氨酸的肽纳米线上，均匀地涂布了单分散的金纳米晶体，金纳米晶体的晶相可通过投射电子显微镜观察。

9.4　结　　论

我们总结了碳纳米管和纳米线生物传感器发展的最新进展。这些纳米设备超灵敏的生物传感潜力，已经从技术发展视野所证明。传感尺寸的减小和传感元件接近生物分子的大小（即 1～100nm），用这些技术构建的设备，可能检测到更小的单个分子。本领域的发展可能使当前生物技术发生革命性变化。然而，尽管灵敏度提高了，但可靠性可能会带来问题，尤其是从含有许多其他分子的样品中只检测到少数分子。必须做艰苦的努力去制造设备和发展实验方法，才能实现它的巨大潜力和实际应用。

致谢

我们要感谢 M. Meyyappan 博士、Jie Han 博士、Alan Cassell 博士、Wendy Fan 博士和 Harry Partridge 博士对我们准备手稿期间的鼓励和技术讨论。这项工作还得到了美国国家航空航天局的支持。

参 考 文 献

[1] Kong, J., Franklin, N.R., Zhou, C.W., Chapline, M.G., Peng, S., Cho, K., and Dai, H. (2000) Nanotube molecular wires as chemical sensors. Science 287, 622–625.

[2] Li, J. and Ng, H. T. (2004) Carbon nanotube sensors, in Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology (Nalwa, H. S., ed.), American Scientific Publishers, Santa Barbara, CA, Vol. 1, 591–601.

[3] Cui, Y., Wei, Q., Park, H., and Lieber, C. M. (2001) Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species. Science 293, 1289–1292.

[4] Li, C., Zhang D., Liu X., Han, S., Tang, T., Han, J., and Zhou C. (2003) In_2O_3 nanowires as chemical sensors. Appl. Phys. Lett. 82(10), 1613–1615.

[5] Dresselhaus, M. S., Dresselhaus, G., and Eklund, P. C. (ed.). (1996) Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes, Academic, New York.

[6] Ebbessen, T. W. (1997) Carbon Nanotubes: Preparation and Properties, CRC Press, Boca Raton, FL.

[7] Saito, R., Dresselhaus, M. S., and Dresselhaus, G. (1998) Physical Properties of Carbon Nanotubes, World Scientific, New York.

[8] Tománek, D. and Enbody, R. (2000) Science and Application of Nanotubes, Kluwer Academic, New York.

[9] Iijima, S. (1991) Helical microtubules of graphitic carbon. Nature 354, 56–58.

[10] Iijima, S. and Ichihashi, T. (1993) Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. Nature 363, 603–605.

[11] Dai, H. (2002) Carbon nanotubes: synthesis, integration, and properties. Acc. Chem. Res. 35(12), 1035–1044.

[12] Collins, P. G., Arnold, M. S., and Avouris, P. (2001) Engineering carbon nanotubes and nanotube circuits using electrical breakdown. Science 292, 706–709.

[13] Tans, S. J., Verschueren, A. R. M., and Dekker, C. (1998) Room-temperature transistor based on a single carbon nanotube. Nature 393, 49–52.

[14] Fuhrer, M. S., Nygard, J., Shih, L., et al. (2000) Crossed nanotube junctions. Science 288, 494–497.

[15] Zhou, C. W., Kong, J., Yenilmez, E., and Dai, H. (2000) Modulated chemical doping of individual carbon nanotubes. Science 290, 1552–1555.

[16] Rueckes, T., Kim, K., Joselevich, E., Tseng, G.Y., Cheung, C.L., and Lieber, C.M. (2000) Carbon nanotube-based nonvolatile random access memory for molecu- lar computing. Science 289, 94–97.

[17] Derycke, V., Martel, R., Appenzeller, J., and Avouris, P. (2001) Carbon nanotube inter- and intramolecular logic gates. Nano Lett. 1(9), 453–456.

[18] Bachtold, A., Hadley, P., Nakanishi, T., and Dekker, C. (2001) Logic circuits with carbon nanotube transistors. Science 294, 1317–1320.

[19] Liu, X.L., Lee, C., Zhou, C.W., and Han, J. (2001) Carbon nanotube field-effect inverters. Appl. Phys. Lett. 79(20), 3329–3331.

[20] Rosenblatt, S., Yaish, Y., Park, J., Gore, J., Sazonova, V., and McEuen, P. L. (2002) High performance electrolyte gated carbon nanotube transistors. Nano Lett. 2(8), 869–872.

[21] Vigolo, B., Penicaud, A., Coulon, C., Sauder, C., Pailler, R., Journet, C., Bernier, P., and Poulin, P. (2000) Macroscopic fibers and ribbons of oriented carbon nanotubes. Science 290, 1331–1334.

[22] de Heer, W. A., Chatelain, A., and Ugarte, D. (1995) A carbon nanotube fieldemission electron source. Science 270, 1179, 1180.

[23] Rinzler, A. G., Hafner, J. H., Nikolaev, P., Lou, L., Kim, S. G., Tomanek, D., Nordlander, P., Colbert, D. T., and Smalley, R. E. (1995) Unraveling nanotubes: field emission from an atomic wire. Science 269, 1550–1553.

[24] Dai, H., Hafner, J. H., Rinzler, A. G., Colbert, D. T., and Smalley, R. E. (1996) Nanotubes as nanoprobes in scanning probe microscopy. Nature 384, 147–150.

[25] Wong, S., Joselevich, E., Woolley, A., Cheung, C., and Lieber, C. M. (1998) Covalently functionalized nanotubes as nanometer-sized probes in chemistry and biology. Nature 394, 52–55.

[26] Li, J., Cassell, A., and Dai, H. (1999) Carbon nanotubes as AFM tips: measuring DNA molecules at the liquid/solid interfaces. Surf. Interface Anal. 28, 8–11

[27] Nguyen, C. V., Chao, K. J., Stevens, R. M. D., Delzeit, L., Cassell, A., Han, J., and Meyyappan, M. (2001) Nanotechnology 12, 363–367.

[28] Liu, C. F., Fan, Y. Y., Liu, M., Cong, H. T., Chen, H. M.,and Dresselhaus, M. S. (1999) Hydrogen storage in single-walled carbon nanotubes at room temperature. Science 286, 1127–1129.

[29] Che, G., Lakshmi, B. B., Fisher, E. R., and Martin, C. R. (1998) Carbon nanotubule membranes for electrochemical energy storage and production. Nature 393, 346–349.

[30] Collins, P. G., Bradley, K., Ishigami, M., and Zettl, A. (2000) Extreme oxygen sensitivity of electronic properties of carbon nanotubes. Science 287, 1801–1804.

[31] Sumanasekera, G.U., Adu, C.K.W., Fang, S., and Eklund, P.C. (2000) Effects of gas adsorption and collisions on electrical transport in single-walled carbon nanotubes. Phys. Rev. Lett. 85(5), 1096–1099.

[32] Ng, H. T., Fang, A., Li, J., and Li, S. F. Y. (2001) Flexible carbon nanotube membrane sensory system: a generic

platform. J. Nanosci. Nanotechnol. 1(4), 375–379.

[33] Besteman, K., Lee, J.-O., Wiertz, F.G.M., Heering, H.A., and Dekker, C. (2003) Enzyme-coated carbon nanotubes as single-molecule biosensors. Nano Lett. 3(6), 727–730.

[34] Star, A., Gabriel, J.-C. P., Bradley K., and Gruner, G. (2003), Electronic detection of specific protein binding using nanotube FET devices. Nano Lett., in press.

[35] Li, J., Ng, H. T., Cassell, A., Fan, W., Chen, H., Ye, Q., Koehne, J., Han, J., and Meyyappan, M. (2003), Carbon nanotube nanoelectrode array for ultrasensitive DNA detection. Nano Lett. 3(5), 597–602.

[36] Li, J., Cassell, A., Delzeit, L., Han, J., and Meyyappan, M. (2002) Novel three-dimensional electrodes: electrochemical properties of carbon nanotube ensembles. J. Phys. Chem. B 106, 9299–9305.

[37] Sotiropoulou, S. and Chaniotakis, N. A. (2003) Carbon nanotube array-based biosensor. Anal. Bioanal. Chem. 375, 103–105.

[38] Walter, E. C., Penner R. M., Liu, H., Ng, K. H., Zach, M. P., and Favier, F. (2002) Sensors from electrodeposited metal nanowires. Surf. Interface Anal. 34, 409–412.

[39] Morales, A. M. and Lieber, C. M. (1998) A laser ablation method for the synthesis of crystalline semiconductor nanowires. Science 279, 208–211.

[40] Huang, M. H., Mao, S. Feick, H., Yan, H., Wu, Y., Kind, H., Weber, E., Russo, R., and Yang, P. (2001) Room-temperature ultraviolet nanowires nanolasers. Science 292, 1897–1899.

[41] Balavoine, F., Schultz, P., Richard, C., Mallouh, V., Ebbesen, T. W., and Mioskowski, C. (1999) Helical crystallization of proteins on carbon nanotubes: a first step towards the development of new biosensors. Angew. Chem. Int. Ed. 38(13/14), 1912–1915.

[42] Braun, E., Eichen, Y., Sivan, U., and Ben-Yoseph, G. (1998) DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire. Nature 391, 775–778.

[43] Bethune, D. S., Kiang, C. H., de Vries, M. S., Gorman, G., Savoy, R., Vazquez, J., and Beyers, R. (1993) Cobalt-catalyzed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. Nature 363, 605–607.

[44] Thess, A., Lee, R., Nikolaev, P., et al. (1996) Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes. Science 273, 483–487.

[45] Kajiura, H., Tsutsui, S., Huang, H., Miyakoshi, M., Hirano, Y., Yamada, A., and Ata, M. (2001) Production of single-walled carbon nanotube ropes under controlled gas flow conditions. Chem. Phys. Lett. 346, 356–360.

[46] Journet, C., Maser, W., Bernier, P., Loiseau, A., Delachapelle, M., Lefrant, S., Deniard, P., Lee, R., and Fischer, J. (1997) Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by the electric-arc technique. Nature 388, 756–758.

[47] Kong, J., Cassell, A.M., and Dai, H. (1998) Chemical vaporde position of methane for single-walled carbon nanotubes. Chem. Phys. Lett. 292, 567–574.

[48] Su, M., Zheng, B., and Liu, J. (2000) A scalable CVD method for the synthesis of single-walled carbon nanotubes with high catalyst productivity. Chem. Phys. Lett. 322, 321–326.

[49] Colomer, J.-F., Stephan, C., Lefrant, S., Tendeloo, G., Willems, I., Kónya, Z., Fonseca, A., Laurent, C., and Nagy, J. (2000) Large-scale synthesis of single-wall carbon nanotubes by catalytic chemical vapor deposition (CCVD)method. Chem. Phys. Lett. 317, 83–89.

[50] Flahaut, E., Govingaraj, A., Peigney, A., Laurent, C., and Rao, C. N. R. (1999) Synthesis of single-walled carbon nanotubes using binary (Fe, Co, Ni) alloy nanoparticles prepared in situ by the reduction of oxide solid solutions. Chem. Phys. Lett. 300, 236–242.

[51] Hafner, J., Bronikowski, M., Azamian, B., Nikolaev, P., Colbert, D., and Smalley, R. E. (1998) Catalytic growth of single-wall carbon nanotubes from metal particles. Chem. Phys. Lett. 296, 195–202.

[52] Bronikowski, M. J., Willis, P. A., Colbert, D. T., Smith, K. A., and Smalley, R. E. (2001) Gas-phase production of carbon single-walled nanotubes from carbon monoxide via the HiPco process: a parametric study. J. Vac. Sci. Technol. A 19, 1800–1805.

[53] Ren, Z. F., Huang, Z. P., Xu, J. W., Wang, J. H., Bush, P., Siegal, M. P., and Provencio, P. N. (1998) Synthesis of large arrays of well-aligned carbon nanotubes on glass. Science 282, 1105–1107.

[54] Delzeit, L., McAninch, I., Cruden, B. A., Hash, D., Chen, B., Han, J., and Meyyappan, M. (2002) Growth of multiwall

carbon nanotubes in an inductively coupled plasma reactor. J. Appl. Phys. 91, 6027–6033.

[55] Li, J., Ye, Q., Cassell, A., Ng, H. T., Stevens, R., Han, J., and Meyyappan, M. (2003) Bottom-up approach for carbon nanotube interconnects. Appl. Phys. Lett. 82(15), 2491–2493.

[56] Stejny, J. J. Trinder, R. W., and Dlugosz, J. (1981) Preparation and structure of poly(sulphur nitride) whiskers. J. Mater. Sci. 16, 3161–3170.

[57] Golden, J. H., DiSalvo, F. J., Frecht, J. M. J., Silcox, J., Thomas, M., and Elman, J. (1996) Subnanometer-diameter wires isolated in a polymer matrix by fast polymerization. Science 273, 782–785.

[58] Venkataraman, L. and Lieber, C. M. (1999) Molybdenum selenide molecular wires as one-dimensional conductors. Phys. Rev. Lett. 83, 5334–5337.

[59] Gates, B., Mayers, B., Cattle, B., and Xia, Y. (2002) Synthesis and characterization of uniform nanowires of trigonal selenium. Adv. Funct. Mater. 12, 219–227.

[60] Limmer, S. J. Seraji, S., Wu, Y., Chou, T. P., Nguyen, C., and Cao, G. (2002) Template-based growth of various oxide nanorods by sol-gel electrophoresis. Adv. Funct. Mater. 12, 59–64.

[61] Barbic, M., Mock, J. J., Smith, D. R., and Schultz, S. (2002) Single crystal silver nanowires prepared by the metal amplification method. J. Appl. Phys. 91, 9341– 9345.

[62] Molares, M. E. T., Buschmann, V., Dobrev, D., Neumann, R., Scholz, R., Schuchert, I. U., and Vetter, J. (2001) Single-crystalline copper nanowires produced by electrochemical deposition in polymeric ion track membranes. Adv. Mater. 13, 62–65.

[63] Müller, T., Heinig, K.-H., and Schmidt, B. (2001) Formation of Ge nanowires in oxidized silicon V-grooves by ion beam synthesis. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. 175, 468–473.

[64] Sugawara, A., Coyle, T., Hembree, G. G., and Scheinfein, M. R. (1997) Self-organized Fe nanowire arrays prepared by shadow deposition on NaCl(110) templates. Appl. Phys. Lett. 70, 1043–1045.

[65] Xia, Y., Yang, P. Sun, Y., Wu, Y., Mayers, B., Gates, B., Yin, Y., Kim, F., and Yan, H. (2003) One-dimensional nanostructures: synthesis, characterization, and applications. Adv. Mater. 15, 353–389.

[66] Zhang, Y., Wang, N., Gao, S., He, R.,Maio, S., Liu, J., Zhu, J., and Zhang, X. (2002) A simple method to synthesize nanowires. Chem. Mater. 14, 3564–3568.

[67] Yang, P. and Lieber, C. M. (1997) Nanostructured high-temperature superconductors: creation of strong-pinning columnar defects in nanorod/superconductor composites. J. Mater. Res. 12, 2981–2996.

[68] Shi, W.-S., Peng, H.-Y., Zheng, Y.-F., Wang, N., Shang, N.-G., Pan, Z.-W., Lee, C.-S., and Lee, S.-T. (2000) Synthesis of large areas of highly oriented, very long silicon nanowires. Adv. Mater. 12, 1343–1345.

[69] Duan, X. F. and Lieber, C. M. (2000) General synthesis of compound semiconductor nanowires. Adv. Mater. 12, 298–302.

[70] Wu, Y. and Yang, P. (2000) Germanium nanowire growth via simple vapor transport. Chem. Mater. 12, 605–607.

[71] Chen, C. C., Yeh, C. C., Chen, C. H., Yu, M. Y., Liu, H. L., Wu, J. J., Chen, K. H., Chen, L. C., Peng, J. Y., and Chen, Y. F. (2001) Catalytic growth and characterization of gallium nitride nanowires. J. Am. Chem. Soc. 123, 2791–2798.

[72] Wang, Y. W., Zhang, L. D., Liang, C. H., Wang, G. Z., and Peng, X. S. (2002) Catalytic growth and photoluminescence properties of semiconductor single- crystal ZnS nanowires. Chem. Phys. Lett. 357, 314–318.

[73] Huang, M. H., Feick, H., Webber, E., and Yang, P. (2001) Catalytic growth of zinc oxide nanowires through vapor transport. Adv. Mater. 13, 113–116.

[74] Vo-Dinh, T., Alarie, J.-P., Cullum, B. M., and Griffin, G. D. (2000) Antibody-based nanoprobe for measurement of a fluorescent analyte in a single cell. Nat. Biotechnol. 18, 764–767.

[75] Campbell, J. K., Sun, L., and Crooks, R. M. (1999) Electro chemistry using single carbon nanotubes. J. Am. Chem. Soc. 121, 3779–3780.

[76] Bard, A. J. (1994) Integrated Chemical Systems: A Chemical Approach to Nanotechnology, John Wiley & Sons, New York, pp. 27–33.

[77] Zhao, J., Buldum, A., Han, J., and Lu, J. P. (2002) Gas molecule adsorption in carbon nanotubes and nanotube bundles. Nanotechnology 13, 195–200.

[78] Guiseppi-Elie, A., Lei, C., and Baughman, R. H. (2002) Direct electron transfer of glucose oxidase on carbon nanotubes. Nanotechnology 13, 559–564.

[79] Azamian, B. R., Davis, J. J., Coleman, K. S., Bagshaw, C. B., and Green, M. L. H. (2002) Bioelectrochemical single-walled carbon nanotubes. J. Am. Chem. Soc. 124, 12,664, 12,665.

[80] Musameh, M., Wang, J., Merkoci, A., and Lin, Y. (2002) Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes. Electrochem. Commun. 4, 743–746.

[81] Kuhr, W. G. (2000) Electrochemical DNA analysis comes of age. Nat. Biotechnol. 18, 1042, 1043.

[82] Sosnowski, R. G., Tu, E., Butler, W. F., O'Connell, J. P., and Heller, M. J. (1997) Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1119–1123.

[83] Umek R. M., Lin, S. W., Vielmetter, J., et al. (2001) Electronic detection of nucleic acids: a versatile platform for molecular diagnosis. J. Mol. Diagn. 3(2), 74–84.

[84] Popovich, N. D. and Thorp H. H. (2002) New strategies for electrochemical nucleic acid detection. Interface 11(4), 30–34.

[85] Wightman, R. M. (1981) Microvoltammetric electrodes. Anal. Chem. 53, 1125A–1134A.

[86] Penner, R. M., Heben, M. J., Longin, T. L., and Lewis, N. S. (1990) Fabrication and use of nanometer-sized electrodes in electrochemistry. Science 250, 1118– 1121.

[87] Fan, F.-R. F. and Bard, A. J. (1995) Electrochemical detection of single molecules. Science 267, 871–874.

[88] Li, J., Stevens, R., Delzeit, L., Ng, H. T., Cassell, A. M., Han, J., and Meyyappan, M. (2002) Electronic properties of multiwalled carbon nanotubes in an embedded vertical array. Appl. Phys. Lett. 81(5), 910–912.

[89] McCreery, R. L. (1991) Carbon electrodes: structural effects on electron transfer kinetics, in Electroanalytical Chemistry vol. 17 (Bard, A. J., ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 221–374.

[90] Nugent, J. M., Santhanam, R. A., and Ajayan, P. M. (2001) Fast electron transfer kinetics on multiwalled carbon nanotube microbundle electrodes. Nano Lett. 1(2), 87–91.

[91] Wong, S. S., Woolley, A. T., Joselevich, E., Cheung, C. L., and Lieber, C. M. (1998) Covalent-functionalized single-walled carbon nanotube probe tips for chemical force microscopy. J. Am. Chem. Soc. 120, 8557, 8558.

[92] Williams, K. A., Veenhuizen, P. T. M., DelaTorre, B. G., Eritja, R., and Dekker, C. (2002) Carbon nanotubes with DNA recognition. Nature 429, 761.

[93] Nguyen, C. V., Delzeit, L., Cassell, A. M., Li, J., Han, J., and Meyyappan, M. (2002) Preparation of nucleic acid functionalized carbon nanotube arrays. Nano Lett. 2(10), 1079–1081.

[94] Chen, R. J., Zhang, Y., Wang, D., and Dai, H. (2001) Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization. J. Am. Chem. Soc. 123, 3838, 3839.

[95] Shim, M., Kam, N. W. S., Chen, R. J., Li, Y., and Dai, H. (2002) Functionalization of carbon nanotubes for biocompatibility and biomolecular recognition. Nano Lett. 2(4), 285–288.

[96] Dieckmann, G. R., Dalton, A. B., Johnson, P. A., et al. (2003) Controlled assembly of carbon nanotubes by designed amphiphilic peptide helices. J. Am. Chem. Soc. 125(7), 1770–1777.

[97] Sun, Y.-P., Fu, K., Lin, Y., and Huang, W. (2002) Functionalized carbon nanotubes: properties and applications. Acc. Chem. Res. 35, 1096–1104.

[98] Wang, S., Humphreys, E. S., Chung, S. Y., et al. (2003) Peptides with selective affinity for carbon nanotubes. Nat. Mater. 2(3), 196–200.

[99] Ulman, A. (1991) An Introduction to Ultrathin Organic Films: From Langmuir-Blodgett to Self-Assembly, Academic, New York.

[100] Guo, Z., Guilfoyle, R.A., Thiel, A.J., Wang, R., and Smith, L.M. (1994) Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. Nucleic Acids Res. 22(24), 5456–5465.

[101] Beier, M. and Hoheisel, J. D. (1999) Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips. Nucleic Acids Res. 27(9), 1970–1977.

[102] Vo-Dinh, T. (2002) Nanobiosensors: probing the sanctuary of individual living cells. J. Cell. Biochem. Suppl. 39,

154–161.

[103]Vo-Dinh, T., Cullum, B. M., and Stokes, D. L. (2001) Nanosensors and biochips: frontiers in biomolecular diagnostics. Sens. Actuators B 74, 2–11.

[104]Johnson, J. C., Yan, H., Schaller, R., Haber, L. H., Saykally, R. J., and Yang, P. (2001) Single nanowires lasers. J. Phys. Chem. B 105(46), 11,387–11,390.

[105] Woolley, A. T., Guillemette, C., Cheung, C. L., Housman, D. H., and Lieber, C. M. (2000) Direct haplotyping of kilobase-size DNA using carbon nanotube probes. Nat. Biotechnol. 18, 760–763.

[106] Andrew, T. and Mirkin, C. A. (2000) Haplotyping by force. Nat. Biotechnol. 18, 713.

[107]Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., and Ding, W. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 266, 66–69.

[108] Sistare, M. F., Holmberg, R. C., and Thorp, H. H. (1999) Electrochemical studies of polynucleotide binding and oxidation by metal complexes: effects of scan rate, concentration, and sequence. J. Phys. Chem. B 103, 10,718–10,728.

[109] Guo, Z., Sadler, P. J., and Tsang, S. C. (2002) Immobilization and visualization of DNA and proteins on carbon nanotubes. Adv. Mater. 10(9), 701–703.

[110] Braden, B. C. (2000) X-ray crystal structure of an anti-Buckminsterfullerene antibody Fab fragment: biomolecular recognition of C60. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 12,193–12,197.

[111] Erlanger, B. F., Chen, B.-X., Zhu, M., and Brus, L. (2001) Binding of an antifullerene IgG monoclonal antibody to single wall carbon nanotubes. Nano Lett. 1, 465–467.

[112] Saxl, O. (2001) Opportunities for industry in the application of nanotechnology. The Institute of Nanotechnology, Stirling, Scotland (http://www.nano.org.uk/ contents.htm).

[113] Keren, K., Krueger, M., Gilad, R., Ben-Yoseph, G., Sivan, U., and Braun, E. (2002) Sequence-specific molecular lithography on single DNA molecules. Science 297, 72–75.

[114] Ford, W., Harnack, O., Yasuda, A., and Wessels, J. M. (2001) Platinated DNA as precursors to templated chains of metal nanoparticles. J. Adv. Mater. 13, 1793– 1797.

[115] Seidel, R., Mertig, M., and Pompe, W. M. (2002) Scanning force microscopy of DNA metallization. Surf. Interface Anal. 33, 151–154.

[116] Richter, J., Seidel, R., Kirsh, R., Mertig, M., Pompe, W., Plaschke, J., and Schackert, H. K. (2000) Nanoscale palladium metallization of DNA. Adv. Mater. 12, 507–510!

[117] Richter, J., Mertig, M., Pompe, W., Mönch, I., and Schackert, H. K. (2001) Construction of highly conductive nanowires on a DNA template. Appl. Phys. Lett. 78, 536–538.

[118] Christopher, A., Monon, F., and Woolley, A. T. (2003) DNA-templated construction of copper nanowires. Nano Lett. 3(3), 359–363.

[119] Harnack, O., Ford, W. E., Yasuda, A., and Wessels, J. M. (2002) Tris(hydroxymethyl)phosphine-capped gold particles templated by DNA as nanowire precur- sors. Nano Lett. 2(9), 919–923.

[120] Patolsky, F., Weizmann, Y., Lioubashevski, O., and Willner, I. (2002) Au-nano-particle nanowires based on DNA and polylysine templates. Angew. Chem. Int. Ed. 41(13), 2323–2327.

[121] Djalali, R., Chen, Y., and Matsui, H. (2002) Au nanowire fabrication from sequenced histidine-rich peptide. J. Am. Chem. Soc. 124(46), 13,660–13,661.

第 10 章　酶通信的碳纳米管系统

J. Justin Gooding, Joe G. Shapter

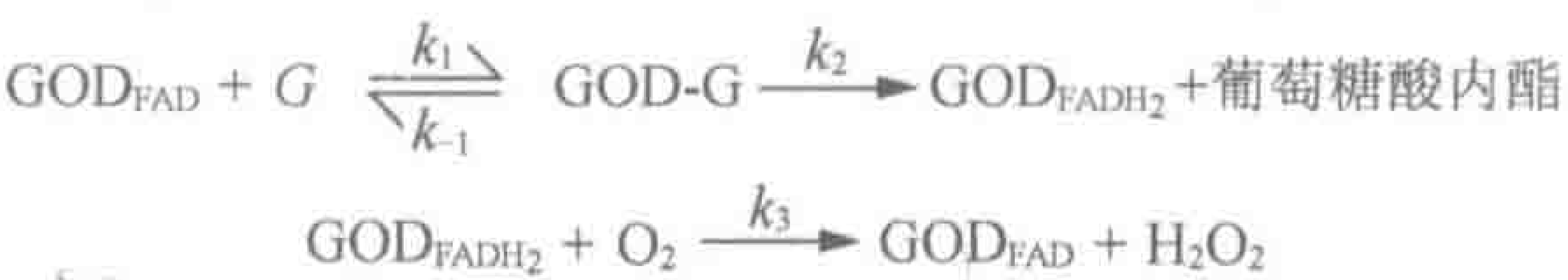
概　　述

酶和电极之间的有效电子转移，对于理解氧化还原性质本质及开发基于蛋白质生物传感器和生物电子设备非常重要。实现有效的电子转移蛋白质的一项策略是在蛋白质内建立电极，以便接近蛋白质的氧化还原活性中心。为了实现这一目标，需要极其小的电极。可以小到直径 1nm 的碳纳米管具有这样的电极潜力。本章概述朝着该目的方向的近期研究结果，即经历电极表面垂直排列的单壁碳纳米管的自组装，然后蛋白质附着到管的游离末端。

关键词：碳纳米管；自组装；微过氧化物酶 MP-11；葡萄糖氧化酶；电化学；酶电极；烷基硫醇；自组装单层；原子力显微镜

10.1　导　　论

氧化还原酶和电极界面之间的相互作用和电子交换的研究有两个重要的原因：第一，它有助于理解蛋白质氧化还原性能本质[1,2]；第二，酶和电极之间的直接电子转移的关键是无介质的发展，也被称为第三代酶生物传感器。无介质生物传感器，在酶恢复它的活性形式的再循环中不需要辅助底物。无介质酶生物传感器的概念最适用氧化还原酶，如方案 10.1 所示葡萄糖氧化酶，酶氧化葡萄糖并在过程中还原。酶在再循环中利用自然界的氧或另一介导物如（如在许多血糖仪使用）二茂铁来实现酶恢复到活性氧化形式。酶以直接进行氧化还原的能力避免了次级反应，使体内和辅助底物浓度可能变化的其他环境中完成可靠的传感。



$$\mathrm{GOD_{FAD}} + G \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathrm{GOD\text{-}G} \xrightarrow{k_2} \mathrm{GOD_{FADH_2}} + \text{葡萄糖酸内酯}$$

$$\mathrm{GOD_{FADH_2}} + \mathrm{O_2} \xrightarrow{k_3} \mathrm{GOD_{FAD}} + \mathrm{H_2O_2}$$

方案 10.1　葡萄糖氧化酶氧化葡萄糖成葡萄糖内酯的反应机制

大多数氧化还原活性的生物分子，其氧化还原中心嵌入到糖蛋白内[1]。例如，在有葡萄糖氧化酶的情况下，蛋白质的外部和黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）氧化还原活性中心之间的最近距离是 13Å[3]。其结果是，电子不能在酶和电极之间有效转移，因此，需要介质或氧化还原分程传递。也有一些例外情况，如过氧化物酶、漆酶、“蓝色”铜蛋白及天青蛋白，其中氧化还原中心位于接近蛋白质的表面，因此可用电化学来测定。已经

出现了各种各样的方法来改进，电极和通常涉及修饰电极或蛋白质，以允许蛋白质和电极之间的更紧密结合而增强通信。

最常使用热解石墨边缘面内的电极[4]和自组装单层（SAM）改性的金电极[5]来实现有效的蛋白质通信。热解石墨的端面包含许多有机官能基，如醇、酚、羧酸和其他羰基。这些边缘平面可以进行快速的电子转移，同时通常保持蛋白质的功能状态。然而，热解石墨提供了许多酶分子结合宏观表面。因此，虽然酶和电极之间的通信通常是有效的，但无法控制探测单个酶或在分子水平上建立生物电子系统。不过，有可能使用碳纳米管（CNT）作为酶通信的电极。

10.1.1 氧化还原蛋白通信的碳纳米管电极

碳纳米管是中空的圆柱体，由包裹在封端或开放端圆柱体的石墨片组成[6]。在多壁碳纳米管（MWCNT）存在的情况下，同心的石墨小管是在直径 2～25nm 的范围内，片之间为 0.34nm。单壁碳纳米管（SWCNT），单层石墨片无缝卷成典型 1～2nm 封端单个圆柱体。所有的碳原子被 sp^2 杂化。单壁碳纳米管可以是金属导体、半导体或小带隙半导体，这取决于它们的直径和手性[7]。封闭的纳米管可以在氧化环境如硝酸中打开。与封闭的纳米管相比证明，开放式的碳纳米管具有优异的电子传输性能[2,8～10]。典型的碳纳米管开口端，通常包含羧酸和与热解石墨的边缘平面一样的醌功能性。因此，开放端可以比喻为边缘热解石墨的平面，和对热解石墨的基底面具有类似的电子转移性质的管壁。

多壁碳纳米管或单壁碳纳米管，已经用于制备电极。迄今文献中提到的大部分纳米管电极，是通过与填料化合物形成糊状物，并将其包裹到电极体上来制备电极，或简单地将纳米管分散在溶剂中，然后滴涂在电极上，在电极表面留下纳米管床。以这种方式制成的电极显示，具有对铁氰化物[11]和一些相关的生物分子的电催化性质[8,12,13]。最近 Wang 等[14]的一篇文章很好地证明了这种电催化性，其中观察到大多数氧化酶的反应产物，过氧化氢的氧化，并且还原电位比用其他碳表面电位低得多。低电势使葡萄糖的检测，只有来自普通干扰物如抗坏血酸、乙酰米多酚和尿酸的少量干扰。修饰纳米管电极被蛋白质进一步修饰。蛋白质吸附到电极或共价附着到管上[17]，以便使酶与电极之间进行通信[15,16]。

Davis 等[15]提供了用碳纳米管电极实现电子转移到蛋白质的首个实例，其中多壁碳纳米管电极首先在硝酸中打开，然后与液体石蜡、三溴甲烷、矿物油或水混合。细胞色素 c 和天青蛋白吸附到保留活性的管上或管内。纳米管电极显示，具有探测这些蛋白质氧化还原位点的能力，这些蛋白质是观察平面边缘热解石墨的高手。类似的结果已由其他科学工作者获得，他们用靠近蛋白质如细胞色素 c [10,18]和辣根过氧化物酶（HRP）表面的活性位点，探索氧化还原蛋白[19,20]。在有辣根过氧化物酶的情况下，电子转移速率常数为 $2.48s^{-1}$，比在修饰 SAM 金电极上观察到的，辣根过氧化物酶 $0.29s^{-1}$ 显著更快[21]。

Yamamoto 等[20]的研究也表明，用辣根过氧化物酶改性的碳纳米管电极，可能与第二种酶，如葡萄糖氧化酶或乳酸氧化酶接口，进而分别产生了用于葡萄糖或乳酸盐的传感器。

基于 CNT 电极也应用于通常不能直接通信的酶，即葡萄糖氧化酶的通信[2,22]。在 Guiseppi-Elie 等[22]的研究中，制备了活化的单壁碳纳米管床电极而酶吸附在电极上。有人认为，电子直接转移到葡萄糖氧化酶是可能的，因为能吸附到活化的纳米管上，就允许少量纳米管装配定位于酶的 FAD 辅基的隧道距离内。发现电子转移的速率是 $1.7s^{-1}$。Zhao 等[2]报道了非常类似的速率 $1.6s^{-1}$，其中除了用多壁碳纳米管外，同样的条件制造了葡萄糖氧化酶修饰的碳纳米管电极。有趣的是，电子转移的速率与葡萄糖氧化酶吸附于阳极石墨电极的速率相同[23]，但比葡萄糖氧化酶共价连接到改性的 SAM 金电极速率 $0.026s^{-1}$ 显著更快[24]。

葡萄糖氧化酶的直接电子转移研究，说明了修饰 CNT 电极的潜在优势。然而，采用随机缠结碳纳米管进行的所有研究中，都会产生定义不清的电极表面和定义不清的蛋白质固定化。这种表面研究强烈表明，电子转移主要出现在管端部[2,8~10]，尽管许多研究已明确，蛋白质是沿着管壁及两端吸附[15~17,22,25~27]。然而，Sotiropoulou 和 Chaniotakis [28]报道认为，葡萄糖氧化酶有选择地吸附到多壁碳纳米管壁上方的端部。

排列整齐的纳米管电极会提供更多的、固定化和与氧化还原蛋白通信的受控表面。已经制造出单纳米管[29]和纳米管排阵列[11,28,30,31]。在这些初步的研究中，只有 Gao 等[31]、Sotiropoulou 和 Chaniotakis[28]修饰了定向纳米管电极。Gao 等[31]绕纳米管电化学沉积了导电聚合物鞘，Sotiropoulou 和 Chaniotakis [28]将葡萄糖氧化酶吸附在管中。我们也用氧化还原酶修饰排列的碳纳米管电极，提供酶和电极之间直接有效的电子转移。

10.1.2　实现直接将电子转移给酶的定向碳纳米管电极

在我们的研究中，采用定向 CNT 电极的制造，首先通过修改 Liu 等[32]的方法，依赖于单壁碳纳米管的缩短，其中在浓硫酸和浓硝酸（3∶1 的比例）混合酸中超声波处理，纳米管被氧化。根据切割时间，所得纳米管减少几百纳米数量级的长度。缩短的纳米管的端部是开放的，终端有羧基（图 10.1）。

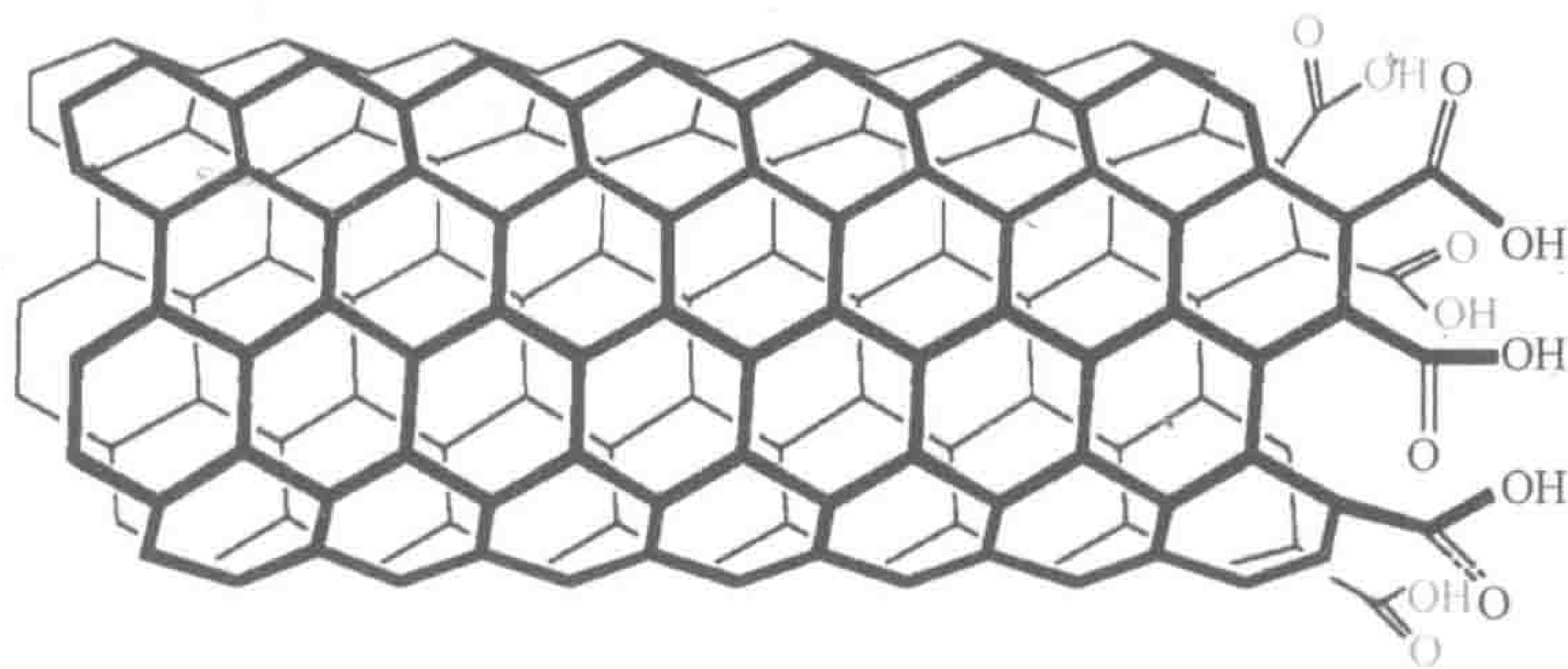
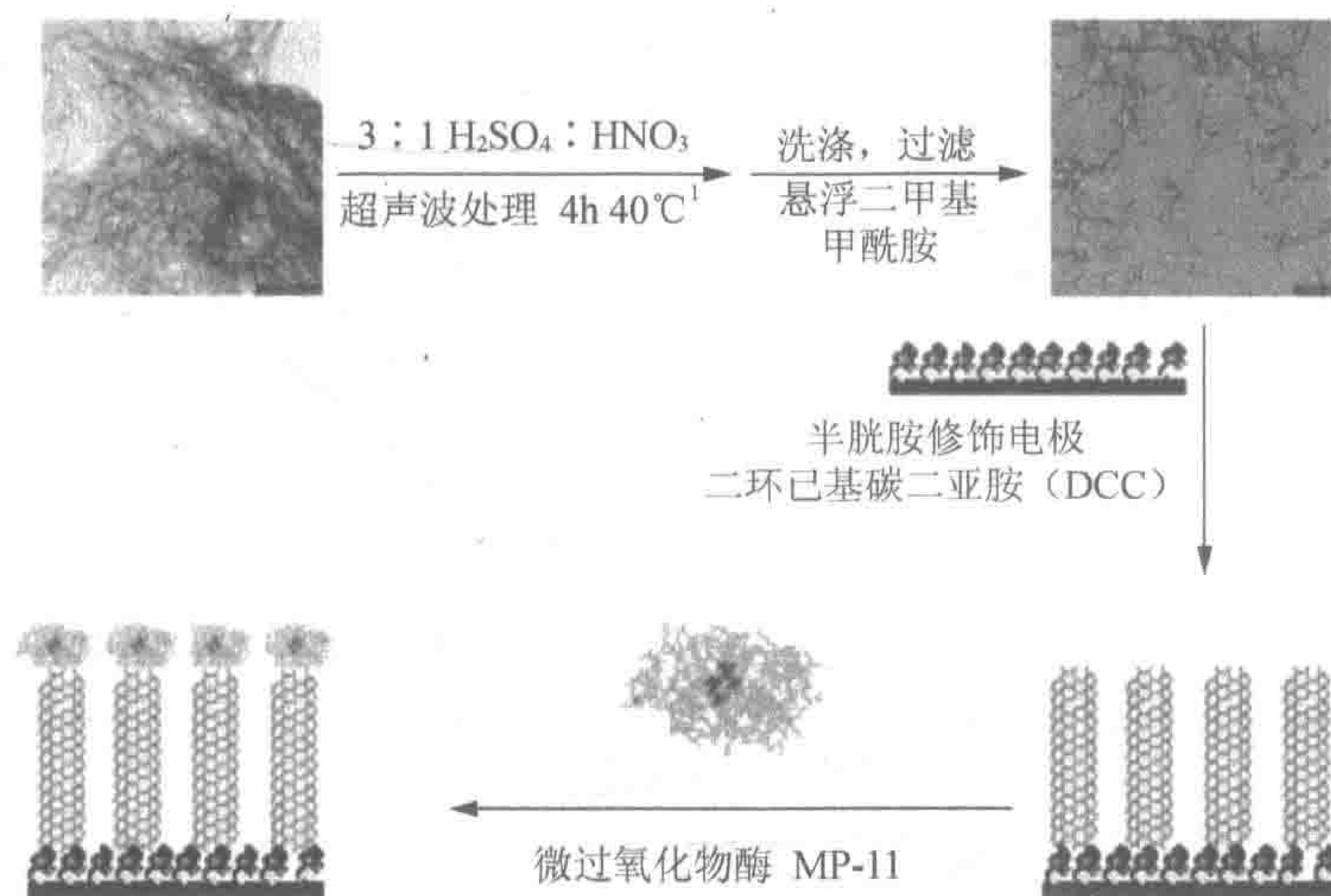


图 10.1　缩短的开放末端单壁碳纳米管显示氧化缩短过程形成羧酸的结果

以这种方式缩短的单壁碳纳米管，能以许多种方式自组装正常定向到表面，包括用链烷醇巯基乙胺（$HSCH_2CH_2NH_2$）修饰的方式，然后将其附着于金表面[33]。其他方法包括将羧酸末端管简单装配到银的表面[34]，或使用配位离子如 Zn^{2+} [35]或 Fe^{3+} [36]锚定到缩短的 SWCNT 表面上。我们已经将正常缩短的 SWCNT 定向到金电极表面，按照方案 10.2 中所示的步骤，用巯基乙胺 SAM 修饰。通过二环已基碳二亚胺（DCC）激活羧酸，纳米管与修饰的 SAM 共价连接。图 10.2A 示碳纳米管的定向。图 10.2A 显示，正常直立于金表面的单壁碳纳米管。图 10.2A 横截面图显示，在图 10.2B 中附着于表面的管高度不超过 20nm。此外，纳米管在表面似乎是以丛的方式出现而不是以单独的管出现。如果 SAM 修饰表面在管中的温育时间增加，则在表面上可观察到更大密度的管子。进一步的证据表明，这些图像表示直立在表面的 SWCNT 来自于图 10.2C 中的图像，其中可见管丛特征的出现。图 10.2D 的横截面显示这些特征之间的高度有很大不同，并且我们认为这些管是正常直立的。



方案 10.2　步骤参与制造对准缩短 SWCNT 阵列与酶如微过氧化物酶 MP-11 或葡萄糖氧化酶的直接沟通

在使用二环已基碳二亚胺对缩短的单壁碳纳米管的活化中，管两端均被激活。因此，管末端没有附着于表面，氧化还原活性物如酶可共价连接（方案 10.2）。在我们的工作中，已将二茂铁与小过氧化物酶 MP-11 和葡萄糖氧化酶附着在一起。为了探索这些对齐的壁碳纳米管将电极电子直接转移给酶的能力，首先我们研究了过氧化物酶 MP-11（图 10.3）[37]。通过铁原卟啉 IX 不被多肽屏蔽的马心细胞色素 c 蛋白水解法获得了 MP-11 是小氧化还原蛋白，分子质量为 1.9kDa [38]。许多研究者已经证明，可以在 MP-11 和 SAM 修饰电极之间进行电子转移[38~43]。

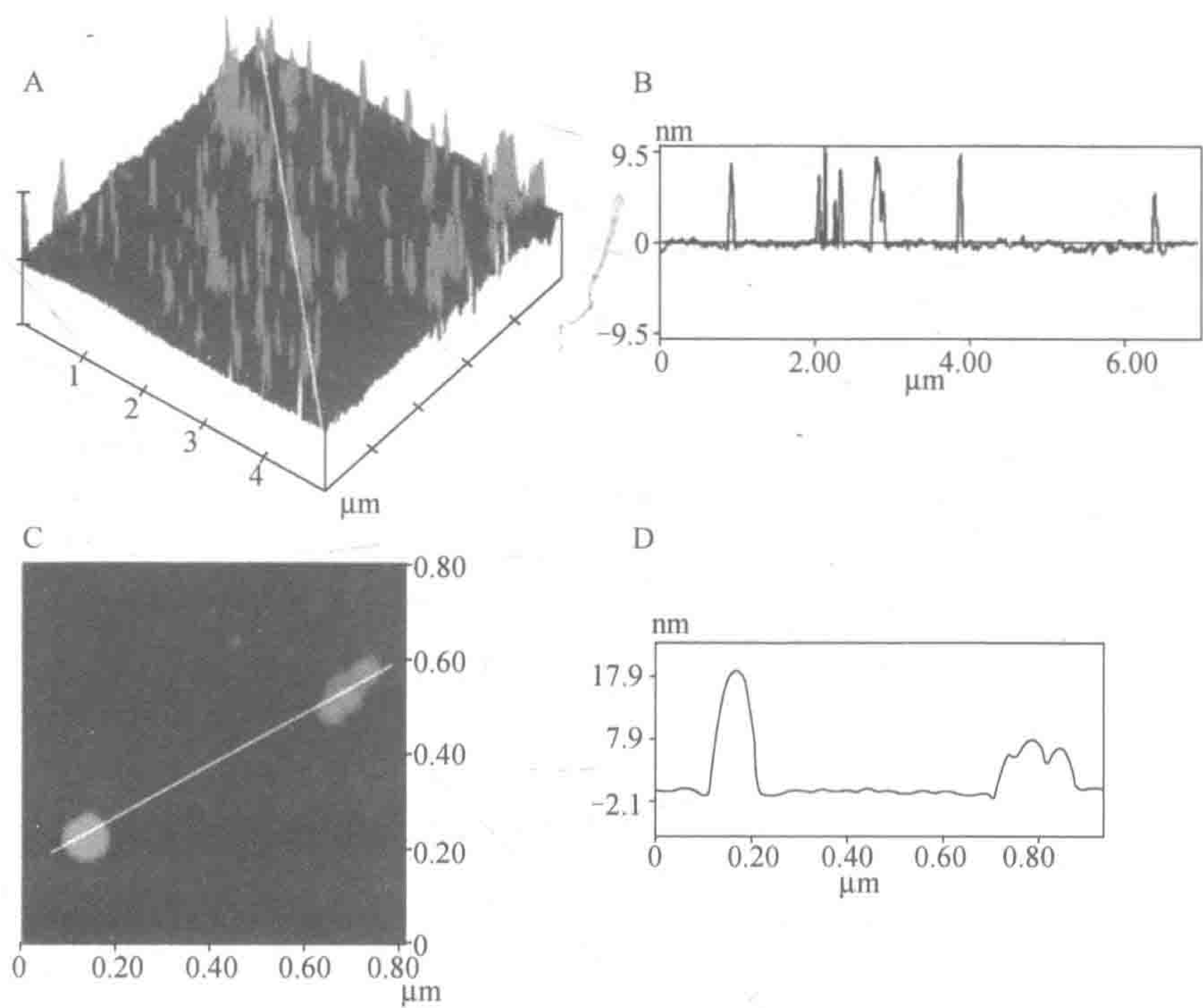


图 10.2　缩短的 SWCNT 排列到金电极表面的原子力显微镜（AFM）图像。（A）管切割 4h，随后用 DCC 活化，然后与巯基乙胺改性的金电极保温 4h。纳米管典型高度为 10～20nm。（B）（A）图中斜线断面。（C）AFM 图像顶视图显示排列碳纳米管束和管表面平躺束。（D）立管和躺管间高度差异

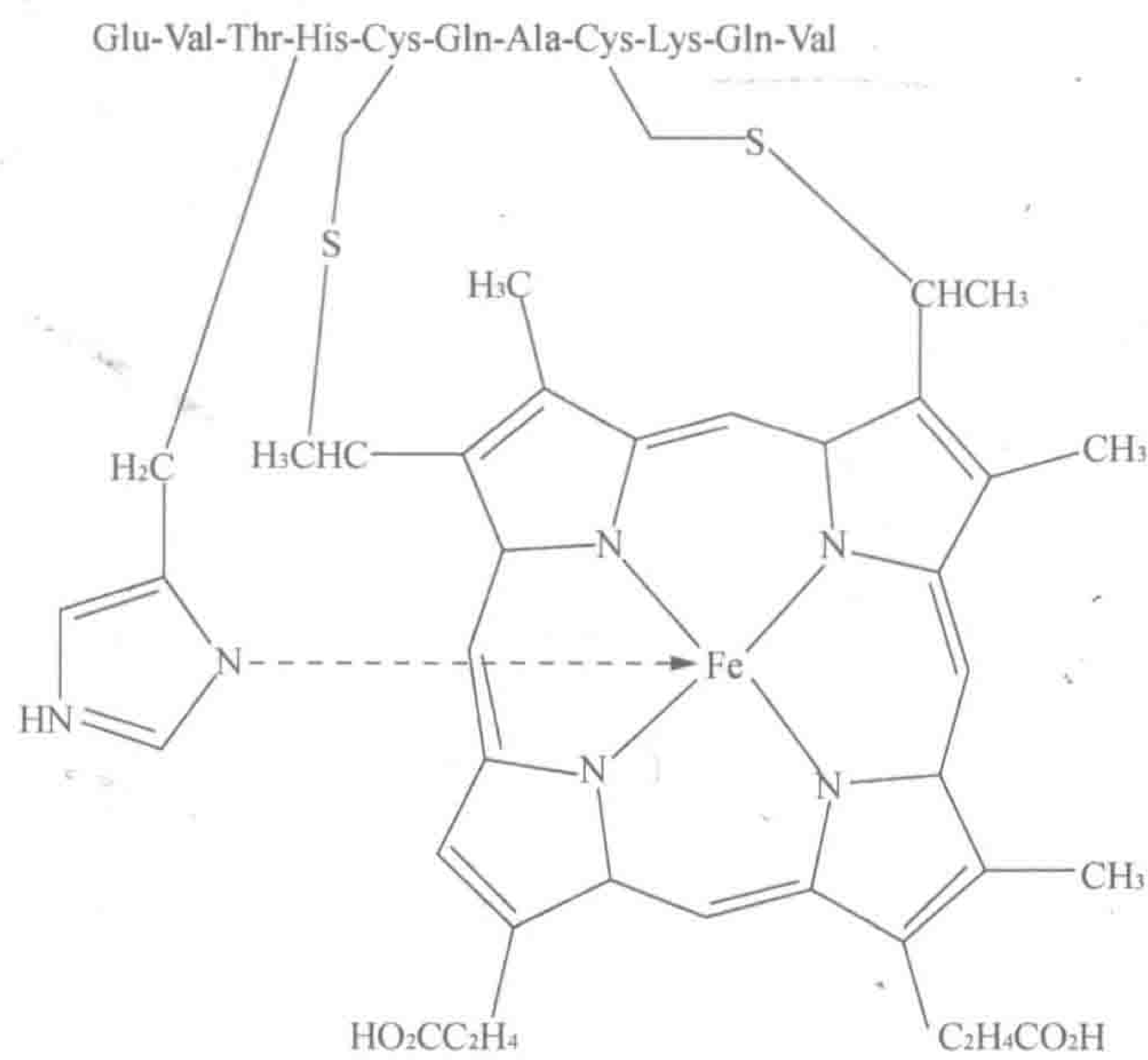


图 10.3　微过氧化物 MP-11 显示氧化还原活性位点和短的十一肽主链

MP-11 附着到定向的单壁碳纳米管修饰的金电极上，相继的电化学调查表明，MP-11

血红素氧化还原活性中心有特征峰，具有−420mV 对比 Ag/AgCl 的表观电极电位（图 10.4）。为了验证是否由于 MP-11 附着到的单壁碳纳米两端的电化学作用，需要进行几个对照实验。如果通过滴涂缩短的 SWCNT 到金电极上，随后通过吸附 MP-11 到碳纳米管上制备单壁碳纳米管床电极，这样产生的 MP-11 修饰电极没有显示氧化还原活性。这种对照提示，如果 MP-11 吸附到纳米管壁上，就好像蛋白质吸附到纳米管壁之前一样[15~17,22,25~27]，通过管壁的电子传输速率不足以产生在图 10.4 中观察到的可鉴别的氧化还原峰。为了验证电化学不是由于 MP-11 吸附到任何半胱胺 SAM 而仍然影响定向纳米管之间，将半胱胺改性的金电极暴露 MP-11，以类似的方式暴露 SWCNT 修饰电极。在这种情况下，可观察到非常小的 MP-11 峰（图 10.4a），但它们比图 10.4b 观察到的峰明显更小。因此，我们可以得出这样的结论，图 10.4b 观察到的电化学图，是由于 MP-11 附着到单壁碳纳米管末端，使电极和位于许多纳米距离的酶之间进行有效通信。

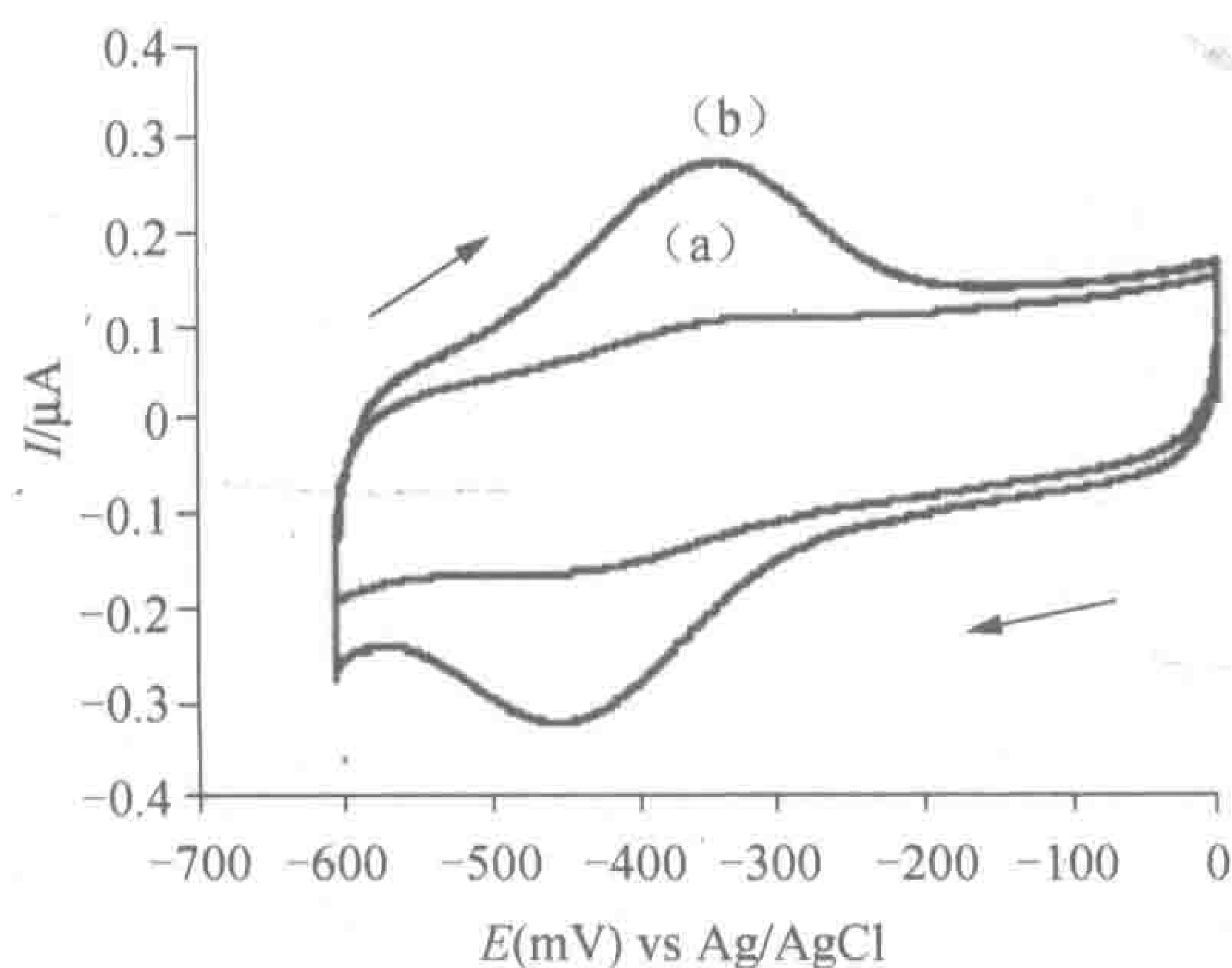


图 10.4　(a)浸渍到二甲基甲酰胺 DMF 和 MP-11 溶液后 Au/半胱胺循环伏安(b)在含有 0.05mol/L KCl 的 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液（pH 7.0）中 Au/半胱胺/SWCNT/MP-11 在氩气存在的条件下，以 100mV/s 对 Ag/AgCl 电极的扫描速率测定值

循环伏安图与扫描速率的变化，可以根据 Laviron 的无扩散模型，用于计算酶和电极之间的电子转移速率[44]。MP-11 附着到被缩短为 4h 的 SWCNT 修饰电极的电子转移的速率为（2.8±0.9）s^{-1}。这个值仅稍低于 MP-11 直接附连到半胱胺修饰的金电极[（6.1±0.9）s^{-1}]和 3-巯基丙酸改性的金电极[（9.4±0.6）s^{-1}]。MP-11 附着到纳米管与除去了碳纳米管（半胱胺修饰电极）等效电极相比，电子转移速率非常相似，证明了碳纳米管作为分子导线的效率。

允许电子直接转移给氧化还原蛋白的单壁碳纳米管的优点是，依赖于能够与酶进行通信，该酶氧化还原活性中心深嵌入糖蛋白中。如在 10.1.1 节所讨论的，葡萄糖氧化酶是氧化还原蛋白的典型例子。如图 10.5 所示，葡萄糖氧化酶附着到单壁碳纳米管末端的 SWCNT 修饰电极的电化学应答结果。认为表观电位约为−430mV 对比 Ag/AgCl 电极的氧化还原小峰，是葡萄糖氧化酶的 FAD 氧化还原中心。这些实验初步表明，可以实现电子直接转移到葡萄糖氧化酶。本章的其余部分，详细列出了用来获得本节所介绍结果的实验方案。

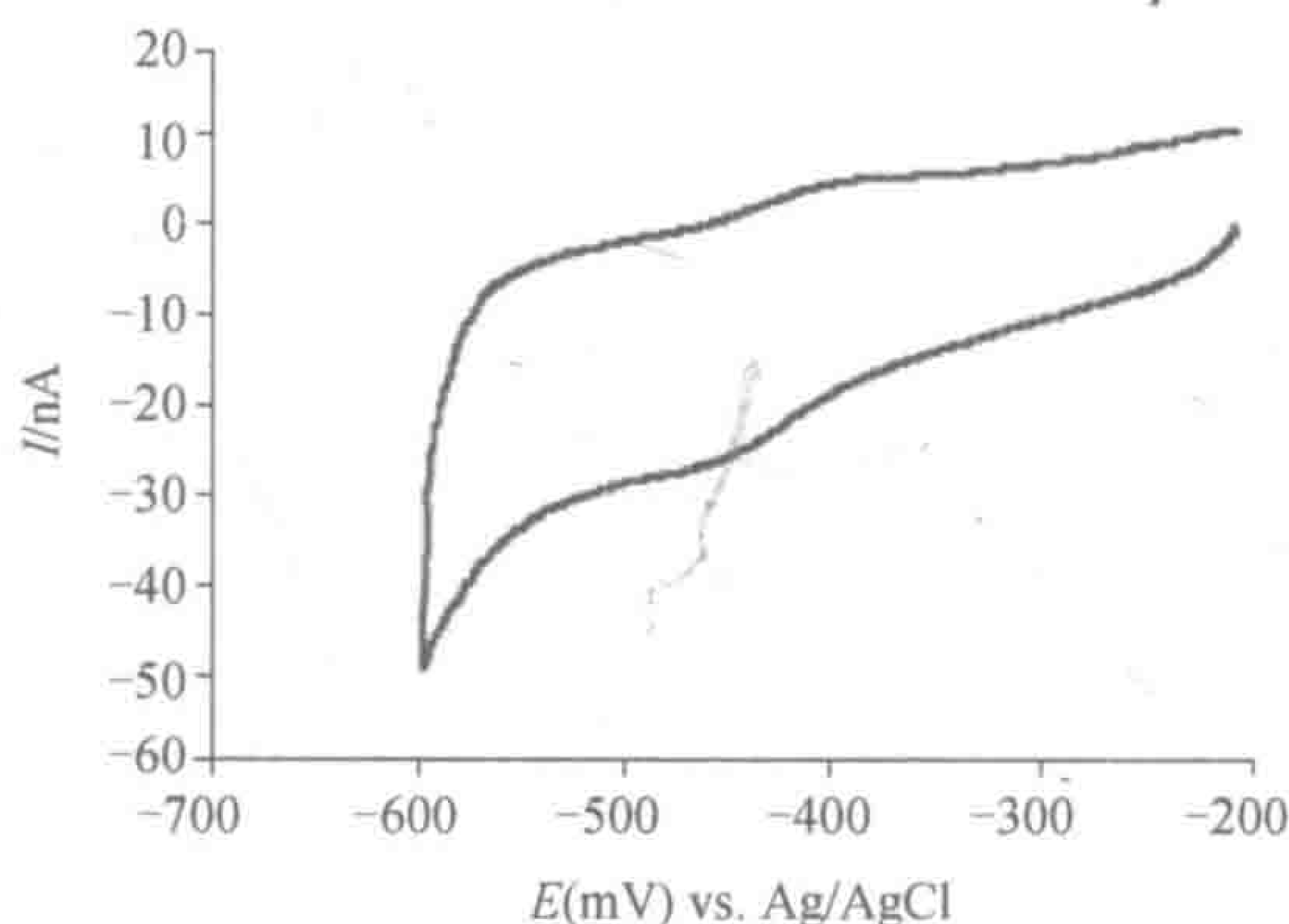


图 10.5　葡萄糖氧化酶附着排列 CNT-修饰的金电极，在含有 0.5mol/L 的 KCl 的 0.05mol/L 磷酸缓冲液（pH 7.0）中在氩气存在的条件下以×10mV/s 的扫描速率测定的循环伏安

10.2　材　　料

1）金工作电极。我们使用多晶硅堆积的金电极制备了环氧玻璃密封的直径 1mm 的金线（Aldrich 公司，悉尼，澳大利亚）（见 10.4 节注意事项 1）[45]。可选择，特别是成像表面或由 Mazurkiewicz 等[46]描述的那样，蒸发到热云母上制备分子平滑金表面。

2）Ag/AgCl 参考电极（BAS 公司，拉法叶，印第安纳州，美国）。

3）白金标记反向电极（自制）或从 BAS 公司中选择。

4）设置为三电极（BAS 公司）的电化学池。可选择，我们使用 20ml 具有适当孔塑料盖的样品管。

5）抛光布和 1μ、0.3μ和 0.05μ氧化铝抛光粉（Buehler 公司，莱克布拉夫，伊利诺伊州，美国）。

6）超声波清洗机（Unisonics 公司，悉尼，澳大利亚）。

7）稳压器（型号：BAS 100B）。

8）卡里 20 双光束紫外-可见光分光光度计。

9）具有纳秒示波器 4 控制器多模系统扫描探针显微镜/原子力显微镜数字仪。

10）飞利普 CM 200 透射电子显微镜。

11）碳纳米管（Carbon Nanotechnologies 公司，休斯顿，德克萨斯州，美国）。

12）浓硫酸（98%）和浓硝酸的溶液（70%）[3∶1（V/V）]。

13）乙醇（95%）。

14）二甲基甲酰胺（DMF）（Prolabo 公司，曼彻斯特，英国）。

15）DCC（Aldrich 公司）。

16）聚四氟乙烯膜，Millipore MF™ 膜过滤器，键入 0.45μm HA。

17）热板搅拌器。

18）半胱胺（2-巯基乙胺）（Sigma 公司，悉尼，澳大利亚）。

19）微过氧化物酶 MP-11（Sigma 公司）。

20）磷酸盐缓冲液（0.3mol/L NaCl，用 KH_2PO_4 和 K_2HPO_4 配置的 5mmol/L 的磷酸盐，pH 为 7.0）。

21）0.01mol/L 的 HEPES 缓冲液，pH 为 7.5。

22）Eppendorf 管（500μl）。

23）氩气。

10.3 方　　法

10.3.1 金表面的制备

1)用氧化铝粉末与 Milli-Q 水混合，开始用 1.0μ的膏，然后用 0.3μ的铝，最后用 0.05μ粉末形成混合糊状物，完成抛光金电极的镜面。按轻画八字的方式，每种粉末抛光约 5min。

2）将抛光电极置于装一半 Milli-Q 水的容器中；然后在超声波仪内超声 10min。

3）超声处理后，加入 0.05mol/L 硫酸到电化学清洗池，放置抛光金电极、参考电极和反电极，并连接到稳压器。

4）−300mV 和 1500mV 之间执行循环伏安，反复循环至少 20min 或直到循环伏安图稳定为止（见 10.4 节注意事项 2）。

10.3.2 单壁碳纳米管的切割

1）称取 2mg 未切割的纳米管到样品管中。

2）加入 10ml 制备的酸与碳纳米管混合。

3）按希望时间超声处理样品管（见 10.4 节注意事项 3）。

4）将超声处理的溶液放入烧杯中，并用 Milli-Q 水稀释至 500ml。

5）经 0.45μm 孔经的特氟隆膜在布氏漏斗中真空过滤，收集碳纳米管。

6）去除酸溶液并用 1.5L 的 Milli-Q 水洗涤纳米管，以减少它们的酸性。

7）用通用指示剂测试滤液的 pH，以确保最低 pH 5.0，如果 pH＜5.0，继续用 Milli-Q 水洗涤。

8）将含有缩短纳米管的膜浸入到 10ml 乙醇中，超声处理 15s（稍微长一点时间膜就会被破坏），用镊子从溶液中取出膜。

9）乙醇-纳米管溶液超声处理 20min。

10）吸取 1ml 乙醇-碳纳米管溶液放入干净的样品管。

11）将溶液加热以蒸发大部分的乙醇，留下乙醇薄膜使缩短的碳纳米管容易再分散。

12）加入 10ml（0.2mg/ml）DMF 和轻轻摇动再分散纳米管。缩短的碳纳米管现在可以使用了。

10.3.3　切割的单壁碳纳米管长度表征

1）在乙醇中用不同的切削时间分散原来的和缩短的单壁碳纳米管。

2）在直径3mm的铜格栅上加入一滴或两滴分散液。

3）让两种滴加的分散液在室温下过夜蒸发。

4）将样品插入到透射型电子显微镜，并拍摄几张图片。

5）通过手动测量透射电子显微镜图像中的长度，确定在任何切削时间制备的每个缩短SWCNT的长度。至少测定分布在图像中100个单独索（见10.4节注意事项3和4）。

10.3.4　电极表面单壁碳纳米管的组装

10.3.4.1　定向纳米管的组装

1）准备75%的乙醇中含1mmol/L的半胱胺溶液。

2）吸取200μl半胱胺溶液放入到500ml Eppendorf管中。

3）将金电极（修饰前立即洗涤）放到Eppendorf管中，以便使金层浸在溶液中。

4）半胱胺单层自组装至5h。

5）取出电极并用乙醇彻底冲洗。

6）在乙醇中，超声处理15s，以除去可能的表面污染物。

7）吸取200μl在DMF（0.2mg/ml）中分散的缩短碳纳米管到Eppendorf管中，并添加0.5mg的DCC（浓度约为2mmol/L）。

8）将半胱胺涂覆电极浸入到纳米管溶液中，放置一定时间（一般为4h），在此期间，纳米管将共价附着到半胱胺涂层电极上。

9）取出缩短的SWCNT修饰电极，用DMF、乙醇洗涤，然后用磷酸盐缓冲液洗涤（见10.4节注意事项5和6）。

10.3.4.2　MP-11的附件

1）在pH 7.5的HEPES缓冲液中，配置浓度为0.5mg/ml的微过氧化物酶MP-11溶液。

2）将缩短的SWCNT的修饰电极放入MP-11溶液中，保持4℃并孵育过夜。

3）取出电极并用HEPES缓冲液漂洗，然后用磷酸缓冲液去除结合松散的酶。

10.3.5　定向单壁碳纳米管的原子力显微镜成像

1）新鲜制备的分子平滑的金基板，按前面介绍的方法脱模[46]。

2）用10.3.4.1节介绍的方法制备定向纳米管。

3）使用商业硅悬臂/tip头（奥林巴斯）以他们的基础共振频率，通常从275～320kHz变化轻敲模式成像。

4）记录高度和相位图像。

5）使用数字仪离线软件横截面分析测量 SWCNT 的高度和长度（见 10.4 节注意事项 7）。

10.4 注意事项

1. 金表面的清洗是表面上形成 SAM 决定质量高低的重要一环。因此，修饰电极表面组装之前，必须清洗蒸发金的表面。在多晶金表面的情况下，重要的是用环氧树脂将金密封到玻璃管中，使其在清洗中能耐受酸的条件。大多数环氧树脂在酸性或碱性条件下会软化。我们所用的环氧树脂是 EPON 825 与来自澳大利亚壳牌能耐酸和耐碱的 EPI-CURE 3271 固化剂。

2. 电化学清洗过程，涉及通过氧化而蚀刻掉金表面阳极（正极）的电位。随着电位回复到负极，所形成的金氧化降低，可观测到显著的脱模峰。电化学清洗过程的另一个优点是脱模峰的面积可以决定金电极电化学易进面积。电化学清洁步骤是脱模峰的面积可能产生电荷的变化，然后发现电极区域存在 480mC/cm^2 转化因子[47]。

3. 碳纳米管进行超声处理的时间越长，分布的长度就越短，但缩短管形成束就越厚。利用高分辨率透射电子显微镜或扫描隧道显微镜，可测定如先前所述，将分子包被到平滑金表面管中分布的长度和宽度[46]。任一技术都能给出相同的预期分布长度。

4. 我们还观察了管的长度与分散到不同的溶剂如 DMF 中管的质量之间的关系。虽然我们还量化了长度关系，但管可被分布到给定溶剂中的量还要通过 UV-VIS 吸收来监测。

5. 从这一点来说，将它们用于电极或附着的氧化还原酶或其他酶进一步修饰。在缩短 SWCNT 两末端的羧酸，由 DCC 激活以成易受来自胺的亲核攻击的碳二亚胺。因此，为了将物质附加到组装在电极表面上，排列单壁碳纳米管的另一端只需要有游离胺的物质。在我们的研究中，根据 Kraatz[48]的方法，我们合成附着了微过氧化物酶 MP-11、葡萄糖氧化酶、丙胺、二茂铁甲胺。用酶、氨基酸与氨基侧链提供，亲核胺共价结合到单壁碳纳米管上。在每一种情况下，连接过程是相同的，除了要其附着分子在溶剂中是可溶的。在 10.3.4.2 节的程序中呈现微过氧化物的 MP-11 的附着。

6. 在这项研究中所用的短链烷基硫醇，一个潜在的问题是，有光存在的情况下它们都容易被氧化。氧化的结果是，Au-硫醇盐键转换成一个金亚磺酸盐或金磺酸盐键[49]。金亚磺酸盐和金磺酸盐键两者均比 Au-硫醇盐键更不稳定。因此，用单独 SAM 修饰电极进行电化学控制，需要通过循环伏安法，由于亚磺酸盐转化为磺酸盐，有时观察到氧化峰大约＋0.3V 对比 Ag/AgCl 电极。氧化峰被管的附着所抑制。这样的峰存在，表示管子组装前 SAM 质量好的标志。如果制备的 SAM Au-硫醇盐键有很少被氧化或没有被氧化，那么就无法观测到以这样低阳极电位的氧化作用。

7. 来自初步实验的一个重要观察是，虽然透射电子显微镜测量结果表明，平均 100nm 长度分布需要切割 4h，但在原子力显微镜（AFM）图像中的管表面高度只有 10～20nm。我们认为这种异常是 AFM 图像的非自然信号。注意，半胱胺修饰的金表面纳米

管孵育时间越长，管在表面的密度越高。还伴随定向管平均长度的增加。这些观察，提供了 AFM 图像是纳米管定向的良好证据。进一步的证据如图 10.2 所示。可观察到直立纳米管束和横卧纳米管束。

参 考 文 献

[1] Heller, A. (1990) Electrical wiring of redox enzymes. *Acc. Chem. Res.* 23, 128–134.

[2] Zhao, Y. D., Zhang, W. D., Chen, H., and Luo, Q. M. (2002) Direct electron transfer of glucose oxidase molecules adsorbed onto carbon nanotube powder microelectrode. *Anal. Sci.* 18, 939–941.

[3] Hecht, H. J., Schomburg, D., Kalisz, H., and Schmid, R. D. (1993) The 3D structure of glucose oxidase from Aspergillus niger: implications for the use of GOD as a biosensor enzyme. *Biosens. Bioelectronics* 8, 197–203.

[4] Jeuken, L.J.C. and Armstrong, F.A. (2001) Electro chemical origin of hysteresis in the electron-transfer reactions of adsorbed proteins: contrasting behavior of the "blue" copper protein, azurin, adsorbed on pyrolytic graphite and modified gold electrodes. *J. Phys. Chem. B* 105, 5271–5282.

[5] Gooding, J. J. and Hibbert, D. B. (1999) The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrodes. *TrAC* 18, 525–533.

[6] Bernholc, J., Brenner, D., Nardelli, M. B., Meunier, V., and Roland, C. (2002) Mechanical and electrical properties of nanotubes. *Ann. Rev. Mater. Res.* 32, 347–375.

[7] Niyogi, S., Hamon, M. A., Hu, H., Zhao, B., Bhowmik, P., Sen, R., Itkis, M. E., and Haddon, R. C. (2002) Chemistry of single-walled carbon nanotubes. *Acc. Chem. Res.* 35, 1105–1113.

[8] Britto, P. J., Santhanam, K. S. V., and Ajayan, P. M. (1996) Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 41, 121–125.

[9] Luo, H., Shi, Z., Li, N., Gu, Z., and Zhuang, Q. (2001) Investigation of the electrochemical and electrocatalytic behavior of single-wall carbon nanotube film on a glassy carbon electrode. *Anal. Chem.* 73, 915–920.

[10] Wang, J. X., Li, M. X., Shi, Z. J., Li, N. Q., and Gu, Z. N. (2002) Direct electrochemistry of cytochrome c at a glassy carbon electrode modified with single-wall carbon nanotubes. *Anal. Chem.* 74, 1993–1997.

[11] Nugent, J. M., Santhanam, K. S. V., Rubio, A., and Ajayan, P. M. (2001) Fast electron transfer kinetics on multiwalled carbon nanotube microbundle electrodes. *Nano Lett.* 1, 87–91.

[12] Wang, J. X., Li, M. X., Shi, Z. J., Li, N. Q., and Gu, Z. N. (2002) Electrocatalytic oxidation of norepinephrine at a glassy carbon electrode modified with single wall carbon nanotubes. *Electroanalysis* 14, 225–230.

[13] Wang, J. X., Li, M. X., Shi, Z. J., Li, N. Q., and Gu, Z. N. (2002) Investigation of the electrocatalytic behavior of single-wall carbon nanotube films on an Au electrode. *Microchem. J.* 73, 325–333.

[14] Wang, J. X., Musameh, M., and Lin, Y. (2003) Solubilization of carbon nanotubes by nafion toward the preparation of amperometric biosensors. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 2408, 2409.

[15] Davis, J. J., Coles, R. J., and Hill, H. A. O. (1997) Protein electrochemistry at carbon nanotube electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 440, 279–282.

[16] Balavoine, F., Schultz, P., Richard, C., Mallouh, V., Ebbesen, T. W., and Mioskowski, C. (1999) Helical crystallization of proteins on carbon nanotubes: A first step towards the development of new biosensors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 1912–1915.

[17] Huang, W. J., Taylor, S., Fu, K. F., Lin, Y., Zhang, D. H., Hanks, T. W., Rao, A. M., and Sun, Y. P. (2002) Attaching proteins to carbon nanotubes via diimide-activated amidation. *Nano Lett.* 2, 311–314.

[18] Wang, G, Xu, J. J., and Chen, H. Y. (2002) Interfacing cytochrome *c* to electrodes with a DNA-carbon nanotube composite film. *Electrochem. Commun.* 4, 506–509.

[19] Zhao, Y. D., Zhang, W. D., Chen, H., Luo, Q. M., and Li, S. F. Y. (2002) Direct electrochemistry of horseradish peroxidase at carbon nanotube powder microelec- trode. *Sens. Actuators B* 87, 168–172.

[20] Yamamoto, K., Shi, G., Zhou, T. S., Xu, F., Xu, J. M., Kato, T., Jin, J. Y., and Jin, L. (2003) Study of carbon nanotubes—HRP modified electrode and its application for novel on-line biosensors. *Analyst* 128, 249–254.

[21] Gooding, J. J., Erokhin, P., Losic, D., Yang, W. R., Policarpio, V., Liu, J. Q., Ho, F. M., Situmorang, M., Hibbert, D. B., and Shapter, J. G. (2001) Parameters important in fabricating enzyme electrodes using self-assembled monolayers of alkanethiols. *Anal. Sci.* 17, 3–9.

[22] Guiseppi-Elie, A., Lei, C. H., and Baughman, R. H. (2002) Direct electron transfer of glucose oxidase on carbon nanotubes. *Nanotechnology* 13, 559–564.

[23] Chi, Q. J., Zhang, J. D., Dong, S. J., and Wang, E. K. (1994) Direct electrochemistry and surface characterization of glucose oxidase adsorbed on anodized car- bon electrodes. *Electrochim. Acta* 39, 2431–2438.

[24] Jiang, L., McNeil, C. J., and Cooper, J. M. (1995) Direct electron transfer reactions of glucose oxidase immobilised at a self-assembled monolayer. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1293–1295.

[25] Davis, J. J., Green, M. L. H., Hill, H. A. O., Leung, Y. C., Sadler, P. J., Sloan, J., Xavier, A. V., and Tsang, S. C. (1998) The immobilisation of proteins in carbon nanotubes. *Inorg. Chim. Acta* 272, 261–266.

[26] Azamian, B. R., Davis, J. J., Coleman, K. S., Bagshaw, C. B., and Green, M. L. H. (2002) Bioelectrochemical single-walled carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 12, 664, 12, 665.

[27] Shim, M., Kam, N. W. S., Chen, R. J., Li, Y. M., and Dai, H. J. (2002) Functionalization of carbon nanotubes for biocompatibility and biomolecular recognition. *Nano Lett.* 2, 285–288.

[28] Sotiropoulou, S. and Chaniotakis, N.A. (2003) Carbon nanotube array-based biosensor. *Anal. Bioanal. Chem.* 375, 103–105.

[29] Campbell, J. K., Sun, L., and Crooks, R.M. (1999) Electro chemistry using single carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 3779, 3780.

[30] Diao, P., Liu, Z. F., Wu, B., Nan, X., Zhang, J., and Wei, Z. (2002) Chemically assembled single-wall carbon nanotubes and their electrochemistry. *Chem. Phys. Chem.* 3, 898–901.

[31] Gao, M., Huang, S. M., Dai, L., Wallace, G. G., Gao, R. P., and Wang, Z. L. (2000) Aligned coaxial nanowires of carbon nanotubes sheathed with conducting polymers. *Angew. Chem.-Int. Ed.* 39, 3664–3667.

[32] Liu, J., Rinzler, A.G., Dai, H.J., et al. (1998) Fullerene pipes. *Science* 280, 1253– 1256.

[33] Liu, Z., Shen, Z., Zhu, T., Hou, S., Ying, L., Shi, Z., and Gu, Z. (2000) Organizing single-walled carbon nanotubes on gold using a wet chemical self-assembling technique. *Langmuir* 16, 3569–3573.

[34] Wu, B., Zhang, J., Wei, Z., Cai, S. M., and Liu, Z. F. (2001) Chemical alignment of oxidatively shortened single-walled carbon nanotubes on silver surface. *J. Phys. Chem. B* 105, 5075–5078.

[35] Yu, X. F., Mu, T., Huang, H. Z., Liu, Z. F., and Wu, N. Z. (2000) The study of the attachment of a single-walled carbon nanotube to a self-assembled monolayer using X-ray photoelectron spectroscopy. *Surf. Sci.* 461, 199–207.

[36] Chattopadhyay, D., Galeska, I., and Papadimitrakopoulos, F. (2001) Metal-assisted organization of shortened carbon nanotubes in monolayer and multilayer forest assemblies. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 9451–9452.

[37] Gooding, J. J., Rahmat, W., Liu, J., Yang, W. R., Losic, D., Orbons, S., Mearns, F. J., Shapter, J. G., and Hibbert, D. B. (2003) Protein electrochemistry using aligned carbon nanotube arrays. *J. Am. Chem. Soc.* 215, 9006–9007.

[38] Lotzbeyer, T., Schuhmann, W., Katz, E., Falter, J., and Schmidt, H.-L. (1994) Direct electron transfer between covalently immobilised enzyme microperoxidase MP-11 and a cystamine-modified gold electrode. *J. Electroanal. Chem.* 377, 291–294.

[39] Lotzbeyer, T., Schuhmann, W., and Schmidt, H.-L. (1996) Electron transfer principles in amperometric biosensors: direct electron transfer between enzymes and electrode surfaces. *Sens. Actuators* B 33, 50–54.

[40] Lotzbeyer, T., Schuhmann, W., and Schmidt, H.-L. (1997) Minizymes: a new strategy for the development of reagentless amperometric biosensors based on direct electron-transfer processes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 42, 1–6.

[41] Narvaez, A., Dominguez, E., Katakis, I., Katz, E., Ranjit, K. T., Ben-Dov, I., and Willner, I. (1997) Microperoxidase-11-mediated reduction of homoproteins: electrocatalyzed reduction of cytochrome *c*, myoglobin and hemoglobin and electrocatalytic reduction of nitrate in the presence of cytochrome-dependent nitrate reductase. *J. Electroanal. Chem.* 430, 227–233.

[42] Jiang, L., Glidle, A., McNeil, C. J., and Cooper, J. M. (1997) Characterization of electron transfer reactions of microperoxidase assembled at short-chain thiol- monolayers on gold. *Biosens. Bioelectronics* 12, 1143–1155.

[43] Ruzgas, T., Gaigalas, A., and Gorton, L. (1999) Diffusionless electron transfer of microperoxidase-11 on gold electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 469, 123–131.

[44] Laviron, E. (1979) General expression of the linear potential sweep voltam-mogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *J. Electroanal. Chem.* 101, 19–28.

[45] Gooding, J. J., Erokhin, P., and Hibbert, D. B. (2000) Parameters important in tuning the response of monolayer enzyme electrodes fabricated using selfassembled monolayers of alkanethiols. *Biosens. Bioelectronics* 15, 229–239.

[46] Mazurkiewicz, J., Mearns, F.J., Losic, D., Rogers, C., Shapter, J.G., and Gooding, J. J. (2002) Cryogenic cleavage used in atomically flat gold surface production. *J. Vac. Sci. Technol. B* 20, 2265–2270.

[47] Hoogvliet, J. C., Dijksma, M., Kamp, B., and van Bennekom, W. P. (2000) Electrochemical pretreatment of polycrystalline gold electrodes to produce a reproducible surface roughness for self assembly: a study in phosphate buffer pH 7.4. *Anal. Chem.* 72, 2016–2021.

[48] Kraatz, H.-B. (1999) Sythesis and electrochemistry of ferrocenemetylamine and its conjugate acid: crystal structure of ferrocenemethylammonium chloride. *J. Organomet. Chem.* 578, 222–226.

[49] Garrell, R. L., Chadwick, J. E., Severance, D. L., McDonald, N. A., and Myles, D. C. (1995) Adsorption of sulfur-containing molecules on gold—the effect of oxidation on monolayer formation and stability characterized by experiments and theory. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 11, 563–11, 571.

第 11 章　生物分子识别的分子印迹聚合物

Alexandra Molinelli, Markus Janotta, Boris Mizaikoff

概　　述

分子印迹聚合物是结构组织材料合成架构的概念，提供具有分子选择性的结合位点。与生物受体相比，这些聚合物的识别系统具有优越的化学和力学稳定性，在一些领域如仿生催化和工程、生物医学分析、传感器技术或食品工业等领域有潜在的应用优势。特别是为生物相关分子提供选择性的分子印迹聚合物（MIP），将会获得巨大的重视。由此而论，为抗黄酮醇槲皮素印迹聚合物的合成提出的自组装方法，是类黄酮化合物生物学相关研究小组的杰作。通过高效液相色谱法实验，比较几种结构相关分子的印迹和非印迹聚合物颗粒的分离能力，证明了这些生物分子合成选择性识别位点的产物。成熟的槲皮素 MIP，能将槲皮素即使在复杂混合物中进行选择性萃取，展示出具有选择性改良生物分子与纳米级可调功能，设计仿生识别材料的潜力。

关键词：分子印迹聚合物；合成受体；仿生识别；黄酮类化合物；槲皮素；高效液相色谱

11.1　导　　论

在过去的 20 多年中，设计合成能模仿生物功能的分子识别材料的概念，使人们产生了巨大的兴趣[1~7]，并刺激了对结构组织材料的研究。尤其是在纳米级水平，分子印迹技术——通过聚合过程中的模板在大分子矩阵内创建合成的识别位点——已经证明这项技术有各种各样的应用潜力[8,9]。通常，这种方法学是基于利用靶分子（模板）的功能，通过与合适的官能单体“互补”的官能团的相互作用来组装它自己的识别空穴。由任一可切割的共价键或非共价的相互作用提供的这些相互作用，随后通过在高浓度交联剂的存在下，聚合反应完成位点的“冻结”[10~13]。随后除去模板，创建聚合物矩阵中有记忆官能团的空间排列和大小，以及靶分子的结合口袋。从而保证了印迹分析的理想的、高选择性识别，有利于可逆的重新结合过程和仿生识别矩阵内模板化分析物的选择性容纳（图 11.1）。

迄今为止，分子印迹主要由相对低分子质量的模板所证明[14~16]。在过去的几年中，分子印迹聚合物（MIP）的成功制备，专一性靶向实际相关生物分子，如类黄酮[17,18]、霉菌毒素[19]、蛋白质或已经在文献中进行讨论的碳水化合物[20~26]。毫无疑问，合成大分子受体的构型仍然是一项艰巨的任务，专一性生物分子 MIP 选择性制备的合适规程，对

生物学和生物医学有巨大的裨益。

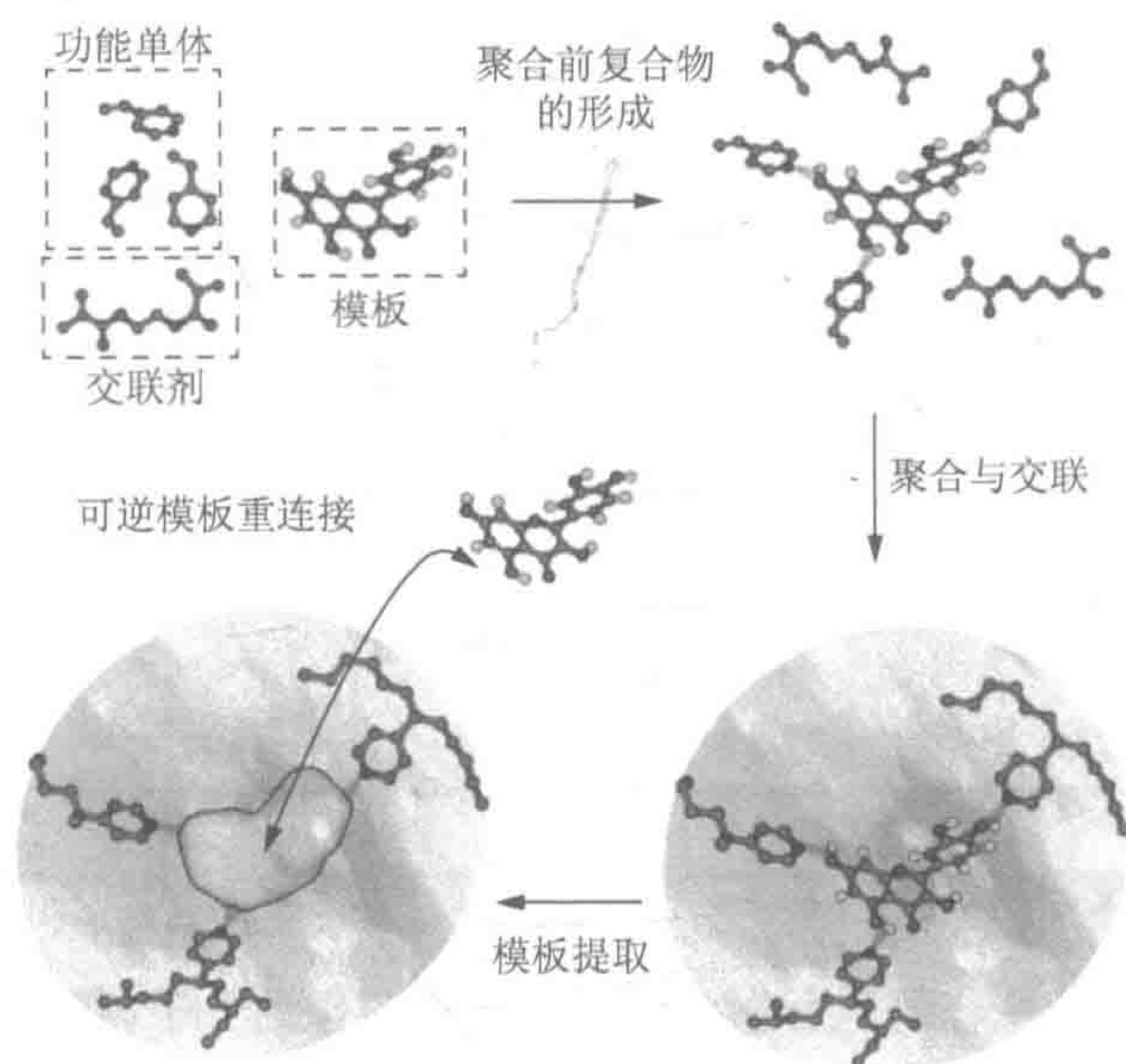


图 11.1　分子印迹原理示意图（彩图请扫封底二维码）

在本研究中，成功地合成了对黄酮醇槲皮素印迹聚合物，并通过高效液相色谱（HPLC）的实验进行了表征。因为表现出具有几种功能性生物分子的槲皮素，能与功能单体非共价相互作用，这种方法是生物分子合成识别矩阵选择构型最恰当的实例。

11.2　材　　料

1）实验室砂浆磨床。

2）标准测试筛（25μm）。

3）HPLC 柱浆料打包机（压力：最大值 10 000psi）。

4）空白不锈钢 HPLC 色谱柱（150mm 或 250mm×4.6mm 内径）。

5）HPLC 系统用 UV/可见光二极管阵列检测器。

6）模板分析（槲皮素）。

7）丙酮，纯度（>99%），分子筛（用作致孔剂）。

8）4-乙烯基吡啶（[4-VP]官能单体）。活性单体储藏低于−10℃（+14℉）的冰箱中。该单体在常温下会逐渐聚合。在温度升高时，会出现聚合，从而产生热量和压力，这可能导致密闭容器破裂。

9）乙二醇二甲基（[EGDMA]交联剂）。

10）2,2′-偶氮二异丁腈（聚合引发剂）。

11）桑色素。

12）(+)儿茶素。

13）芸香苷。

14）2-乙酯基-5,7-二羟基-4′-甲基异黄酮（C-fla）。

11.3 方　法

接下来介绍分子印迹构件——聚合物的合成概要；聚合物应用之前需要的制备步骤包括：研磨、筛分和沉淀；用于制备聚合物粒子分离实验如 HPLC 分离矩阵一样；对所获得的结果进行评估。

11.3.1 聚合物的合成

11.3.1.1 印迹聚合物

按如下方法制备预聚合的混合物：1mmol 槲皮素作为分子模板，在玻璃小瓶（30ml 体积）溶解于 15ml 丙酮中。然后按顺序加入 8mmol 官能单体 4-乙烯基吡啶（见 11.4 节注意事项 1），40mmol 交联剂乙二醇二甲基丙烯酸酯（见 11.4 节注意事项 2）和 2%（*m/m*）2,2′-偶氮二异丁腈。将溶液在冰浴冷却并用氮气吹 5min。最后，水浴中 60℃开始聚合（见 11.4 节注意事项 3 和 4）。

11.3.1.2 对照聚合物

为了正确评估靶分析物获得的印迹效果，以非印迹控制聚合物制备为对照实验。按 11.3.1.1 节介绍的同样程序，合成非印迹聚合物，但不加模板。

11.3.2 合成聚合物程序

以下步骤介绍，如液相层析中分离矩阵（如应用于印迹和对照聚合物的相同程序）一样的构件聚合物加工过程。

1）用瓷研钵和杵将聚合物构件碾碎成小颗粒。

2）在机械研钵内研磨聚合物颗粒 3min。

3）用丙酮和 25μm 筛孔湿筛聚合物粒子。

4）干燥后，主要聚合物颗粒通过过筛而保留，重复步骤 2～4，增加研磨和湿筛，使大部分的聚合物颗粒过筛。

5）收集丙酮-聚合物颗粒沉积物与约 250ml 的丙酮混合去除小于 5μm 的细颗粒。1h 后，丢弃上清液，加入新鲜的丙酮沉淀聚合物颗粒。需要经过几个沉淀步骤，主要是消除细颗粒（见 11.4 节注意事项 5 和 6）。

6）用甲醇洗涤聚合物颗粒，在 45℃的烘箱中干燥 24h。

11.3.3　高效液相色谱分离实验

当评价模板分子和结构相关化合物印迹分离能力和对照聚合物时，基于分子印迹聚合物选择性分离矩阵，将对模板分析物展现选择性记忆行为（表 11.1）。因此，分子印迹聚合物颗粒和对照聚合物颗粒作为 HPLC 实验固定相[27]（见 11.4 节注意事项 7）。

表 11.1　用 HPLC 实验选择类黄酮化合物

名称	槲皮素	桑色素	C-fla
分类	黄酮醇	黄酮醇	异黄酮
分子式	$C_{15}H_{10}O_7$	$C_{15}H_{10}O_7$	$C_{19}H_{16}O_7$
结构查询号	117-39-5	480-16-0	15485-76-4
名称	(+)儿茶酸	芸香苷	
分类	黄酮醇	黄酮醇配糖基	
分子式	$C_{15}H_{14}O_6$	$C_{27}H_{30}O_{16}$	
结构查询号	154-23-4	153-18-4	

1）在约 50ml 的丙酮中加入 3g 聚合物粒子（无论印迹聚合物还是对照聚合物），超声处理并使用空气驱动的流体泵用 200bar 丙酮将聚合物颗粒填入 HPLC 不锈钢柱（250mm×4.6mm 内径）（见 11.4 节注意事项 8）。

2）将填充好的 HPLC 柱（含有任一印迹聚合物颗粒或对照聚合物颗粒）安装放入 HPLC 系统中，并以完成模板提取步骤以便在聚合物矩阵中创建分子特异性识别空穴。

3）从聚合物颗粒中提取的模板分子，用甲醇：乙酸[7：1（*V/V*）]以 1ml/min 流速冲洗，直到基线记录稳定为止。建立可比较条件，以相同的过程装对照柱。然后用乙腈（MeCN 中）：H_2O：乙酸[80：10：10（*V/V/V*）]作为流动相平衡每一柱（直到基线记录稳定为止）（见 11.4 节注意事项 9），仔细地评价模板槲皮素和几个结构模拟的分离和识别性能（图 11.2）。

4）使用对照（非印迹）聚合物颗粒填充作为 HPLC 参考柱，确定模板分析物的选择性和印迹聚合物交叉反应性。

5）在环境温度下以 1ml/min 的流动相的流速完成所有洗脱，并使用二极管阵列紫外/可见光检测器监测 200～450nm 分光光度值。

6）色谱每次运行时，将 2μg 研究化合物溶解于 20μl 流动相中，用 0.2μl 丙酮作为空白标记。

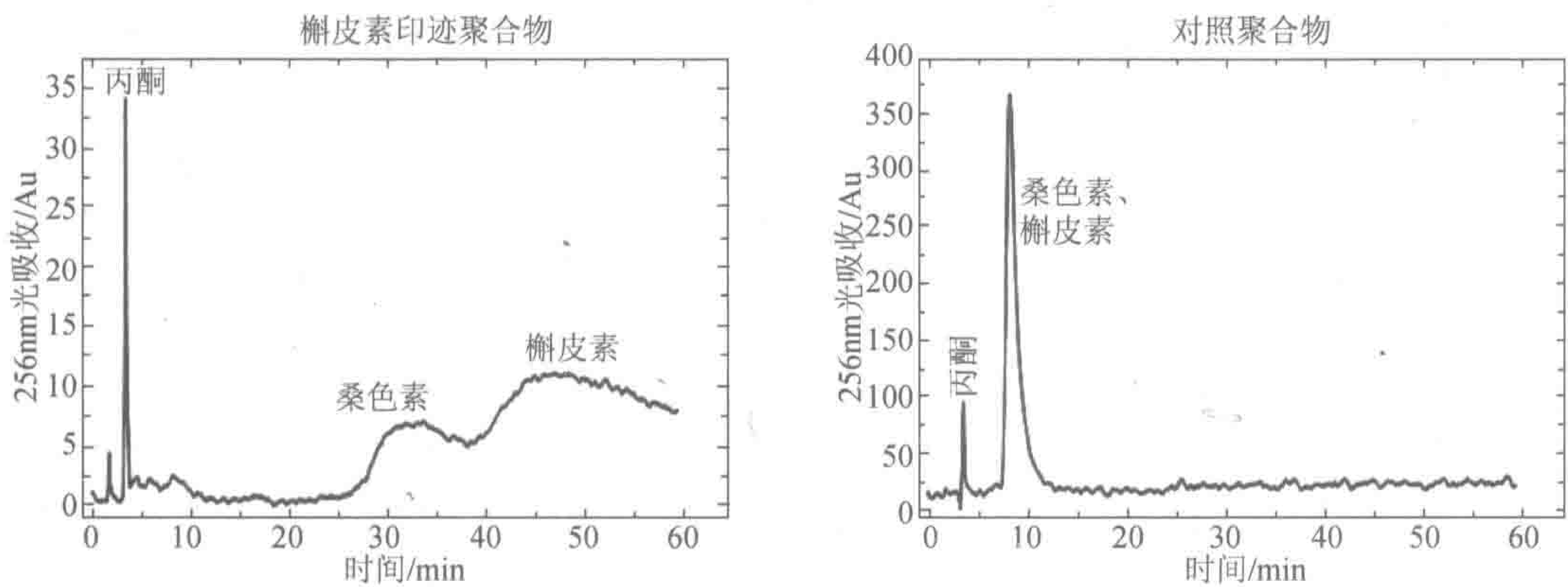


图 11.2　色谱为分子印迹聚合物（A）和对照聚合物（B）用丙酮，桑色素，并在 MeCN 槲皮素（4-VP/EDMA 共聚物）：H_2O：乙酸[80：10：10（*V/V/V*）]为流动相（流速：1ml/min）

11.3.4　评估

几个特征参数可以解释是一个印迹效果已经实现的主要证据（图 11.2，表 11.2）。第一，槲皮素在填充了槲皮素印迹聚合物柱中的停留时间，约为对照柱的 10 倍。印迹柱显示一些结构相关的化合物交联选择性，见表 11.2。然而，印迹柱和对照柱发生的分子印迹槲皮素（保留指数 RI 值为 1）有强烈的差异。根据表 11.2 的数据，三种分析物［芸香苷、(+)儿茶素和 C-fla］与产生的抗槲皮素识别空穴有低交联反应性，而 RI 值为 0.7 的桑色素（见 11.4 节注意事项 10），由于分子结构与印迹分子槲皮素紧密相似，显示相当大的交联反应性。第二，当比较印迹聚合物和对照聚合物[k'_{MIP}=10，k'_{CTL}=1.4 在乙腈：水：乙酸（80：10：10）]时，槲皮素能力因子的巨大差异表现出强烈的印迹影响。第三，印迹柱中的类黄酮峰有相当明显拖尾，是聚合物中或多或少的特异性混合结合位点分布和非特异性位点分布[28]的证据。印迹分子与这些位点不同的相互作用；由于这些相互作用使其在柱中保留了较长时间，因此，产生显著拖尾的宽峰。这些结果强调，用印迹多聚体颗粒填充的 HPLC 色谱柱，适用于合成受体矩阵中，基于仿生识别机制结构密切相关分析物的分离。

表 11.2　以乙腈：水：乙酸[80：10：10（*V/V/V*）]为流动相印迹和非印迹 4-VP/EDMA 聚合物因子、分离因子和 RI 值的结果 a

	t_{CTL}	k'_{CTL}	t_{MIP}	k'_{MIP}	α_{CTL}	α_{MIP}	RI 值
丙酮	3.5	—	3.6	—	—	—	—
槲皮素	**8.4**	**1.4**	**39.5**	**10.0**	**1.0**	**1.0**	**1.0**
桑色素	8.4	1.4	27.8	6.8	1.0	1.5	0.7
(+)儿茶酸	4.9	0.4	5.9	0.7	3.5	15.2	0.2
芸香苷	4.3	0.2	4.9	0.4	6.3	27.9	0.2
C-fla	4.5	0.3	4.7	0.3	5.0	33.5	0.2

a. 流速：1ml/min。黑体数字代表模板分析物的数值

11.3.5　应用：测定红酒中槲皮素的分子印迹固相萃取

由于槲皮素分子印迹聚合物 HPLC 特征，已经证明存在重要的印迹效应，聚合物被用作从红酒中固相萃取槲皮素的吸附剂[18]。HPLC 测量之前，分子印迹聚合物能轻易启动样品污染物的清除，并从红酒槲皮素选择性富集，不需要任何进一步的样品净化程序（图 11.3）。

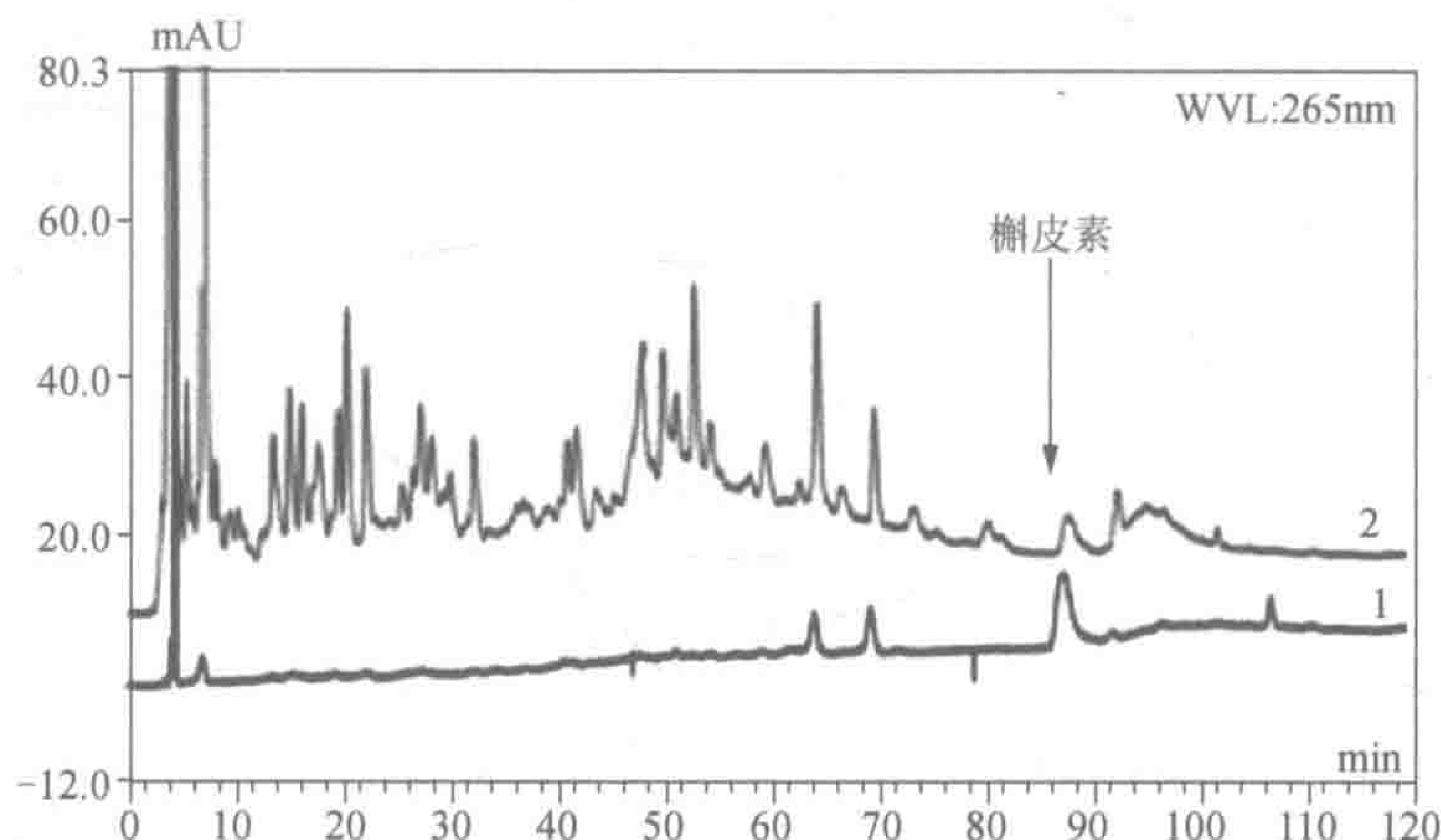


图 11.3　红酒（Merlot）的层析。在 265nm 波长下 MIP 固相萃取之前（2）和之后（1）的扫描；（1）1.75ml 洗脱液之后（转载自参考文献[18]并征得许可）

11.4　注 意 事 项

1.　在聚合之前，为了除去抑制剂必须使用微蒸馏仪器，新鲜蒸馏 4-乙烯基吡啶。蒸馏的 4-乙烯基吡啶溶液，然后可以在温度低于−10℃冰箱中储存几个月。

2.　根据模板分析物的类型，可应用不同的功能单体（包括功能单体的混合物）、交联剂的类型和溶剂[12,29,30]。一个主要的先决条件是在选择溶剂时，化合物要有足够量的充分溶解性。典型的功能单体对溶剂的比例为 3∶4（*V*/*V*）。槲皮素的印迹方法的选择摩尔比是 1∶8∶40（模板∶功能单体∶交联剂）。根据功能单体所需量和选择的交联剂，1∶4∶20 和 1∶10∶60 之间变化的典型比率[30~32]。沉淀过程中的损失（见 11.4 节注意事项 5），在预聚合反应混合物中，应该用最低为 0.18mmol 模板。最终沉淀步骤之后，最小 2g 量聚合物材料是成功的 HPLC 柱填充过程所必需的。功能单体应当根据可能最大数目的相互作用位点选择功能单体，因为在预聚合混合物中，模板分子和功能的单聚体之间稳定复合物的构象和聚合过程将决定印迹的质量。模板的功能性单体和交联剂模板的比例，定义系统，经常要通过实验和误差得到的印迹聚合物的结合性质的表征后确定。如预聚合混合物的核磁共振（NMR）研究方法，为模板和功能单体包括复合物的构象之间适当比例的选择过程提供了方便[33,34]。

3.　聚合必须在一个密封的玻璃小瓶中进行，因为氧是自由基聚合过程中的抑

制剂。

4. 根据模板、在小于 60℃下[自由基启动 2,2′-偶氮二(2,4-二甲基)]热聚合和（在室温或更低）紫外聚合的性质，为启动自由基共聚合提供了替代品。

5. 每次沉淀之前，使用超声波处理步骤，以确保聚合物颗粒和溶剂之间完全混合。准确除去微粒是至关重要的一步，因为 HPLC 固定相材料的填装过程中，细颗粒（直径＜10μm）可导致 HPLC 柱的高背压。减少粒径分配也是好性能 HPLC 柱所必需的，因为使用宽径分配的粒子将导致干扰峰增宽效应。

6. 20～30min 后，得到澄清的上清溶液，表示足够除去了大部分细颗粒。

7. 放射性配体[35,36]和竞争性荧光[37]结合分析，是额外的评价印迹聚合物选择性识别性能的合格技术。如核磁共振[33,34]、红外光谱学或质量-敏感设备[38]的分析技术可以提供识别（结合）情形的补充信息。然而，就我们的个人意见和经验，与亲和层析概念有关的分离技术，特别适合分析 MIP 的识别性能，并且是生物分子基于 MIP 的识别矩阵最有前途的应用。

8. HPLC 柱的精确和细心的填充是非常重要的，因为装入气泡或不均匀填充柱将导致 HPLC 性能的减弱。

9. 流动相的正确选择至关重要，并强烈地依赖于分析物和固定相之间相互作用的性质。在先前[39]相同的溶剂应用聚合作用文献中证实，有利于在层析应用中识别属性最大化。虽然有机溶剂可提高，如氢键和离子相互作用，但应用水介质时，主要是增加疏水相互作用。

10. 计算能力的因素为 $k'=(t-t_0)/t_0$，其中 t 是化合物的保留时间，t_0 对应于保留时间的空白标记（实验中的丙酮）。分离系数计算为$\alpha=k'_{TM}/k'_{TS}$，具有 TM 指示模板分子和 TS 的各实验物质。RI 计算为：$RI=\alpha_{CTL}/\alpha_{MIP}$，其中 MIP 和 CTL 分别表示 MIP 和对照聚合物。模板分析物 RI 值定义 1 并作为参考值。结构相关分子相似 RI 值证明，在分析物、流动相和固定相之间很少相互作用，产生 MIP 的选择性和交联反应性的信息。

致谢

我们非常感激欧盟（QLRT-2001-02323）和奥地利科学基金会（P14122-CHE）对本工作经费的赞助。

参 考 文 献

[1] Kempe, M., Fischer, L., and Mosbach, K. (1993) Chiral separation using molecularly imprinted heteroaromatic polymers. *J. Mol. Recogn.* 6(1), 25–29.

[2] Wulff, G., Heide, B., and Helfmeier, G. (1986) Enzyme-analog built polymers. 20. Molecular recognition through the exact placement of functional groups on rigid matrixes via a template approach. *J. Am. Chem. Soc.* 108(5), 1089–1091.

[3] Andersson, L.I. and Mosbach, K. (1990) Enantiomeric resolution on molecularly imprinted polymers prepared with

only non-covalent and non-ionic interactions. *J. Chromatogr.* 516(2), 313–322.

[4] Takeuchi, T. and Haginaka, J. (1999) Separation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers. *J. Chromatogr.* B 728, 1–20.

[5] Owens, P. K., Karlsson, L., Lutz, E. S. M., and Andersson, L. I. (1999) Molecular imprinting for bio- and pharmaceutical analysis. *Trends Anal. Chem.* 18, 146–154.

[6] Haupt, K. and Mosbach, K. (2000) Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chem. Rev.* 100, 2495–2504.

[7] Andersson, L. I. (2000) Molecular imprinting for drug bioanalysis: a review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay. *J. Chromatogr. B* 739, 163–173.

[8] Haupt, K. (2003) Imprinted polymers—tailor-made mimics of antibodies and receptors. Chem. Commun. 2, 171–178.

[9] Whitcombe, M. J., Rodriguez, M. E., Villar, P., and Vulfson, E. N. (1995) A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 7105–7111.

[10] Mosbach, K. and Ramström, O. (1996) The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology. *Biotechnology* 14, 163–170.

[11] Wulff, G. (1995) Molecular imprinting in crosslinked materials with the aid of molecular templates—a way towards artificial antibodies. *Angew. Chem. Int. Ed.* 34, 1812–1832.

[12] Sellergren, B. (1999) Polymer- and template-related factors influencing the efficiency in molecularly imprinted solid-phase extractions. *Trends Anal. Chem.* 18, 164–174.

[13] Katz, A. and Davis, M. E. (1999) Investigations into the mechanisms of molecular recognition with imprinted polymers. *Macromolecules* 32, 4113–4121.

[14] Zander, A., Findlay, P., Renner, T., and Sellergren, B. (1998) Analysis of nicotine and its oxidation products in nicotine chewing-gum by a molecularly imprinted solid-phase extraction. *Anal. Chem.* 70, 3304–3314.

[15] Mullet, W.M. and Lai, E.P.C. (2000) Determination of theophylline in serum by molecularly imprinted solid-phase extraction with pulsed elution. *Anal. Chem.* 70, 3636–3641.

[16] Yu, Y., Ye, L., Haupt, K., and Mosbach, K. (2002) Formation of a class of enzyme inhibitors (drugs), including a chiral compound, by using imprinted polymers or biomolecules as molecular-scale reaction vessels. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 4460–4462.

[17] Weiss, R., Molinelli, A., Jakusch, M., and Mizaikoff, B. (2002) Molecular imprinting and solid phase extraction of flavonoid compounds. *Bioseparation* 10, 379–387

[18] Molinelli, A., Weiss, R., and Mizaikoff, B. (2002) Advanced solid phase extraction using molecularly imprinted polymers for the determination of quercetin in red wine. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1804–1808.

[19] Weiss, R., Freudenschuss, M., Krska, R., and Mizaikoff, B. (2003) Improving the analysis of mycotoxins in beverages—molecularly imprinted polymers for deoxynivalenol and zearalenone. *Food Addit. Contam.* 20(4), 386–395.

[20] Sellergren, B. (2000) Imprinted polymers with memory for small molecules, proteins, or crystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 1031–1037.

[21] Dabulis, K. and Klibanov, A.M. (1992) Molecular imprinting of proteins and other macromolecules resulting in new adsorbents. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 176–185.

[22] Hjertin, S., Liao, J. L., Nakazato, K., Wang, Y., Zamaratskaia, G., and Zhang, H. X. (1997) Gels mimicking antibodies in their selective recognition of proteins. *Chromatographia* 44, 227–234.

[23] Shi, H. Q. and Ratner, B. D. (2000) Template recognition of protein-imprinted polymer surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* 49, 1–11.

[24] Shi, H. Q., Tsai, W.-B., Garrison, M. D., Ferrari, S., and Ratner, B. D. (1999) Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition. *Nature* 398, 593–597.

[25] Bossi, A., Piletsky, S. A., Piletska, E. V., Righetti, P. G., and Turner, A. P. F. (2001) Surface-grafted molecularly imprinted polymers for protein recognition. *Anal. Chem.* 73, 5281–5286.

[26] Zimmerman, S. C., Wendland, M. S., Rakow, N. A., Zharov, I., and Suslick, K. S. (2002) Synthetic hosts by monomolecular imprinting inside dendrimers. *Nature* 418, 399–403.

[27] Andersson, L. I. (2000) Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field. *J. Chromatogr. B.* 745, 3–13.

[28] Umpleby, R. J. II, Bode, M., and Shimizu, K. D. (2000) Measurement of the continuous distribution of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Analyst* 125, 1261–1265.

[29] Whitcombe, M. J., Alexander, C., and Vulfson, E. N. (1997) Smart polymers for the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 140–145.

[30] Yu, C. and Mosbach, K. (1998) Insights into the origins of binding and the recognition properties of molecularly imprinted polymers prepared using an amide as the hydrogen-bonding functional group. *J. Mol. Recogn.* 11, 69–74.

[31] Ramstrom, O., Ye, L., Krook, M., and Mosbach, K. (1998) Screening of a combinatorial steroid library using molecularly imprinted polymers. *Anal. Commun.* 35, 9–11.

[32] Yilmaz, E., Mosbach, K., and Haupt, K. (1999) Influence of functional and crosslinking monomers and the amount of template on the performance of molecularly imprinted polymers in binding assays. *Anal. Commun.* 36, 167–170.

[33] Idziak, I., Benrebouh, A., and Deschamps, F. (2001) Simple NMR experiments as a means to predict the performance of an anti-17α-ethynylestradiol molecularly imprinted polymer. *Anal. Chim. Acta* 435, 137–140.

[34] Sellergren, B., Lepistoe, M., and Mosbach, K. (1991) Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions: NMR and chromatographic studies on the nature of recog- nition. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 5853–5860.

[35] Andersson, L. (1996) Application of molecular imprinting to the development of aqueous buffer and organic solvent based radioligand binding assays for (S)-propranolol. *Anal. Chem.* 68, 111–117.

[36] Jakusch, M., Janotta, M., Mizaikoff, B., Mosbach, K., and Haupt, K. (1999) Molecularly imprinted polymers and infrared evanescent wave spectroscopy: a chemical sensors approach. *Anal. Chem.* 71, 4786–4791.

[37] Suarez-Rodriguez, J. L. and Diaz-Garcia, M. E. (2001) Fluorescent competitive flow-through assay for chloramphenicol using molecularly imprinted polymers. *Biosens. Bioelectron.* 16, 955–961.

[38] Kobayashi, T., Murawaki, Y., Reddy, P. S., Abe, M., and Fujii, N. (2001) Molecular imprinting of caffeine and its recognition assay by quartz-crystal microbalance. *Anal. Chim. Acta* 435, 141–149.

[39] Kempe, M. and Mosbach, K. (1991) Binding studies on substrate- and enantio-selective molecularly imprinted polymers. *Anal. Lett.* 24, 1137–1145.

第 12 章　表面增强拉曼散射生物分析的等离子纳米结构

Tuan Vo-Dinh, Fei Yan, David L. Stokes

概　　述

表面增强拉曼散射（SERS）光谱是结合现代激光光谱与金属纳米结构的独特的光学金属纳米结构属性，当分子吸附到或接近特殊金属纳米结构，如金、银和过渡金属时，就会强烈增加拉曼信号。本章提供了 SERS 活性金属纳米结构的开发和应用概要，特别是对生物相关化合物的分析。本章的一些亮点包括 SERS 的报道作为免疫读出方法、*SERS* 基因纳米探针、近场扫描光学显微镜 SERS 探针、SERS 作为研究单分子检测的工具及细胞研究的 SERS 纳米探针。

关键词：表面增强拉曼散射；基因组学；单分子探测器和灰；近场扫描光学显微镜；等离子体；生物分析

12.1　导　　论

拉曼光谱是基于研究样品产生典型的非常窄的光谱特征的振动跃迁。因此，它一直被认为是化学和生物学样品鉴定，以及阐明分子结构、表面处理和界面反应的宝贵工具。尽管有这样的优势，拉曼散射也有效率非常差的短处。相比于冷光程序，拉曼光谱分光光度计具有一个固有的小截面（如 $10^{-30}cm^2$/分子），从而排除了分析物检测中的低浓度的可能性，无需特别增强的过程。信号增强的某些模式已包括共振拉曼散射和非线性过程，如连贯的反斯托克斯拉曼散射。然而，需要高功率、多波长激发源限制了这些技术的广泛使用。

尽管如此，过去 20 多年由于表面增强拉曼散射（SERS）效应，特别是在纳米纹理金属表面上吸附分子的发现，又恢复了对拉曼技术的兴趣。这种兴趣的大大增强最早是在 1974 年由 Fleischmann 等[1]的报道，他观察到在电化学表面粗糙的银电极吸附吡啶分子的效果。最初认为增强起因于通过电化学粗糙银电极产生表面积增加，从而升高了增加探测样品的密度。Jeanmaire 和 Van Duyne [2]、Albrecht 和 Creighton [3]后来也证实它的增强（高达 10^8），但由于影响到更复杂的表面增强流程，这仍然是强烈的理论研究的主题。最近的报道也引用了 SERS 增强 10^{13}～10^{15}，从而证明 SERS 有检测单分子的潜力[4~9]。

到 20 世纪 80 年代中期，由于 SERS 基底的积极发展和应用，以多种化学品的 SERS 作为常规分析技术的潜力得到了承认。大量的文章和评论文章证明不断对 SERS 技术有

新的兴趣[10~21]。此外，SERS 的范围已经扩展到包括其他表面增强光谱，如表面增强二次谐波产生[22]和表面增强超拉曼散射[23]。

SERS 效应是基于几个方法的组合，涉及电磁增强和化学增强[20]。电磁增强涉及等离子体激元，这是关系到金属纳米结构增强电磁特性。等离子体激元术语，是由“等离子体振子”衍生的，这是与纵波传播的物质通过大量电子集体运动相关的联合量子。入射光照射这些表面激发金属传导电子，诱导等离子体振子表面导致光谱信号（如 SERS 和表面增强荧光）巨大电磁场增强，用于超灵敏检测生物分子。

用 SERS 研究了生物化合物（如蛋白质、氨基酸、脂质、脂肪、脂肪酸、DNA、RNA、抗体、酶）宿主。经过过去几十年的研究，可靠的 SERS 开发有了广泛的进展，促进 SERS 在生物技术领域的应用迅速扩大，这在几本优秀的评论[24~28]杂志中所证明。本章提供生物相关化合物 SERS 分析等离子纳米结构进展梗概。本章的亮点包括免疫分析读出方法、SERS 基因纳米探针、近场扫描光学显微镜（NSOM）SERS 探针、SERS 作为单分子检测的工具和作为细胞研究的 SERS 纳米探针的报道。

12.2 方　　法

12.2.1 表面增强拉曼散射活性金属电极的发展

电化学粗糙电极是观察表面增强拉曼散射（SERS）效应第一媒介[1]。这种效应的观察结果，在进一步研究中得到证实并建立了增强因子[2,3,14]。虽然研究了几种金属在电化学池中[29~33]的 SERS 活性，但最常用的还是银。电化学制备期间，电极表面的银首先被氧化反应 $Ag \rightarrow Ag^{+}+e^{-}$所氧化，然后，元素银在随后的还原过程中，$Ag^{+}+e^{-} \rightarrow Ag$ 再沉积。氧化还原过程，通常在电极表面上产生 25～500nm 的突起。只有几个电化学氧化还原循环，就出现强的 SERS 信号，通常被称为“激活周期”。

过渡金属如裸铂、钌、铑、钯、铁、钴和镍电极也作为 SERS 基底研究[34~36]。发现过渡金属表现出表面增强因素，幅度从 1～4 个数量级，这取决于金属的性质和表面形态。在一项研究中，铜电极光子的改变导致了 SERS 进一步增加 10 倍的信号[37]。

12.2.2 SERS 活性金属纳米胶体的发展

活性 SERS 的元素金属胶体或不同大小纳米颗粒的混悬剂，可以在溶液中化学成形。因此，可以很容易将它们用在悬浮液中进行原位溶液 SERS 测量。或者，将它们固定在不同的固体介质中，作为基于表面的 SERS 基底。由于是粗糙金属电极，银是最常用的材料。银胶体可以很容易地在碱性条件[44]下，用冰冷的硼氢化钠（$NaBH_4$）[38~40]、柠檬酸三钠[41~43]，或过氧化氢来减少硝酸银的溶解度进行制备。减少湿化学需要的其他新发明技术已经出现。例如，Ahern 和 Garrell[45]描述的独特原位光还原法，以在溶液中产生光胶体，另一个创新方法包括激光消融的从银箔到水溶液的胶体[46]。

胶体金也作为 SERS 活性介质研究。因为金几乎是生物惰性，证明它是 SERS 生物

医学应用中宝贵的材料。此外，当使用近红外（IR）的激发源时，黄金产生大量的 SERS 增强因子。近红外激发辐射在生物医学研究中特别有用，因为它允许在组织中更大的穿透深度，相对可见光辐射而言引起较少荧光背景。金溶胶已用于表面增强拉曼散射，检测各种染料[41,47]组成。特别是用近红外激发时，染料吸附在金胶体，Kneipp 等观察到极大的增强因子（高达 10^{14}）[7]。

12.2.3　基于金属纳米结构的固体 SERS 基质的发展

除了固定化胶体，研究人员已经开发了多种被完全用固体材料制作，如图 12.1 所示固体表面为基础的 SERS 基底。相对于固定化胶体，随后描述的基于 SERS 的固体探针，显示出高度的再现性。此外，纳米壳有电介质芯和金属壳（如 Au/SiO_2），或金属芯和电介质外壳（如 Au 核/SiO_2 壳），或金属芯和金属壳（如 Au 核/Ag 壳、Ag 核/Ag 壳和 Ag 核/Au 壳），提供一种可调谐的几何学，其中，可以精确地控制纳米颗粒表面局部电磁场[48~51]。

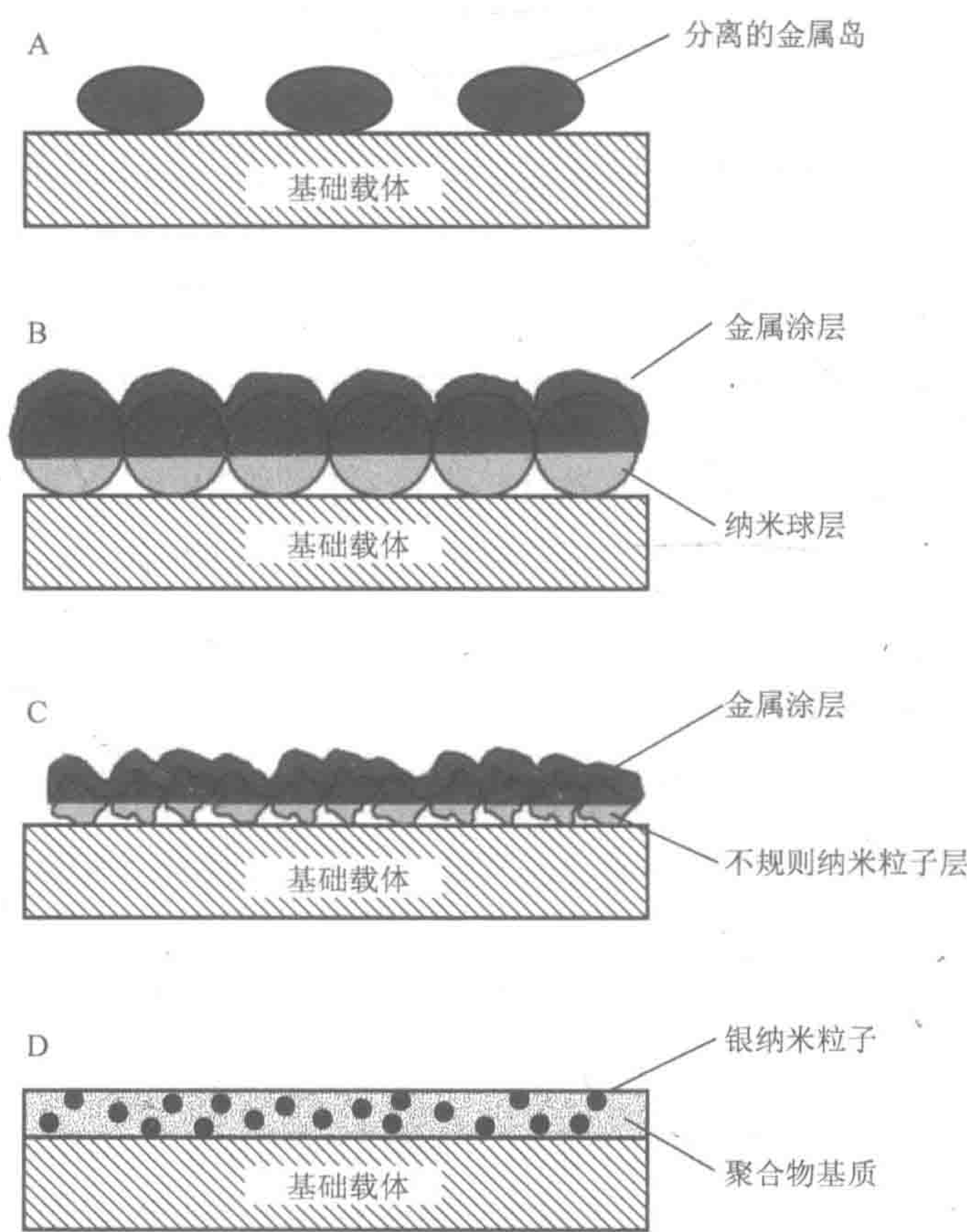


图 12.1　各类 SERS 活性金属纳米结构：（A）金属岛膜；（B）金属涂覆的纳米球（seminanoshells）；（C）金属涂覆随机纳米结构；（D）聚合物涂层嵌入有金属纳米颗粒

12.2.3.1　金属纳米粒子岛膜

基于金属岛膜金属纳米结构的 SERS 基质（图 12.1A）是最容易制备表面介质，但

要使用真空蒸发系统。这样的系统通常配备水晶微量天平，用于监测金属膜的厚度。金属岛膜可以通过沉积到薄（<10nm）的金属层上，直接通过溅射沉积[40]或真空蒸发产生平滑的固体。在这样薄的厚度，由于是聚集的金属层形成的，分离的金属岛的大小和形状可以在很大程度上受金属厚度、沉积速率、几何形状和温度及沉积后退火的影响。为了优化 SERS 活性金属岛膜的生产，已应用于各种诊断技术中，包括光吸收、原子力显微镜、SERS 或它们的组合[52,53]。最近，银岛膜的特点是近场光学显微术（NSOM）与拉曼光谱的结合，从而实现小于 70nm 的分辨率[54]。金属岛膜的缺点在于，它们很容易被典型的生物医学分析[55,56]中的溶剂所干扰。为了尽量减少这种缺点，缓冲金属层，(3-巯基丙基)-三甲氧基硅烷层和有机金属涂料层，已经应用到玻璃支持而稳定的金岛膜[57]。

12.2.3.2　金属涂层纳米球基底

在我们的实验室，我们开发了非常可靠的固体表面 SERS 基底技术，通常描述为通过各种平坦支撑介质支撑的，金属包被电介质纳米球（图 12.1B）。特定尺寸范围（如 50～500nm）内的纳米球是自旋的，以便产生以诱导 SERS 效应所需的粗糙度包被在固体载体上。所得纳米结构化板，然后涂上一层银（50～150nm），它提供了等离子体机制所需的表面传导电子。表面形貌的所有因素很容易控制，从而实现批次与批次之间的高度再现。一个额外的优点是，相对厚的银层比银岛更不容易受到空气氧化。此外，该表面高度抗来自样品溶剂的干扰，使得这种类型的 SERS 基底，非常符合生物医学应用的实际。聚四氟乙烯和乳胶是 SERS 特别适合的基底，因为它们有很宽的各种尺寸，是理想的增强选择。

纳米球基质的制备相对容易。将纳米球悬浮液的 50μl 等分试样，均匀地沉积到电介质平面支撑介质的表面上，如滤纸、纤维素膜、玻璃或石英[58~62]。使用光致抗蚀剂，以产生均匀的单层覆盖，接着将基底在 800～2000r/min 旋转大约 20s。球体黏附在玻璃表面上，从而提供均匀的包被。然后将纳米球包被的载体放置在真空蒸发器中，其中银以 0.15～0.2nm/s 的速率淀积在粗糙表面上。

12.2.3.3　金属涂层纳米颗粒基底

纳米颗粒具有不规则的形状（图 12.1C），也可以用来代替规则形状的纳米球以生产可靠、具有成本效益的 SERS 基底。在我们的实验室研究的电介质纳米颗粒材料，包括氧化铝[63]、二氧化钛[64]和煅制二氧化硅[65]。不规则纳米粒子基底的生产，相当于在 12.2.3.2 节介绍的纳米球基底一样易于实现。一般，5%～10%（m/V）的纳米颗粒的水性悬浮液，旋涂到固体载体介质，然后通过真空蒸发包被 75～150nm 的银。其他研究小组已通过化学方法[66,67]替代真空蒸镀法研究了银涂层。然而，还是真空蒸发制备的基质有出色的再现性。

通过真空蒸发产生的氧化铝基底物已证明是属于最可靠材料，选择模型化合物诱导的信号，具有批与批之间的变化的典型值小于 10%。氧化铝基底的表面由随机分布的表面附聚物和在 10～100nm 的范围内突起。当入射的光子能量与局域型表面等离子体振子

谐振时，表面上这些结构产生大量的电磁场。基于氧化铝基底有大量的应用[68~75]。

银包覆的二氧化钛[64]和热解法二氧化硅[65]也提供高效 SERS 活性的底物。二氧化钛提供 SERS 效应必需的纳米粗糙表面；在我们的探针中使用二氧化钛标称颗粒粒径为 0.2μm。当用 50～100nm 的银涂覆时，这种类型的探针可产生优秀的 SERS 增强，检测各种化合物极限为每份十亿范围内。气相二氧化硅基底允许跟踪检测多环芳烃和农药[64,76]。

12.2.3.4　基于金属包被石英柱 SERS 基底

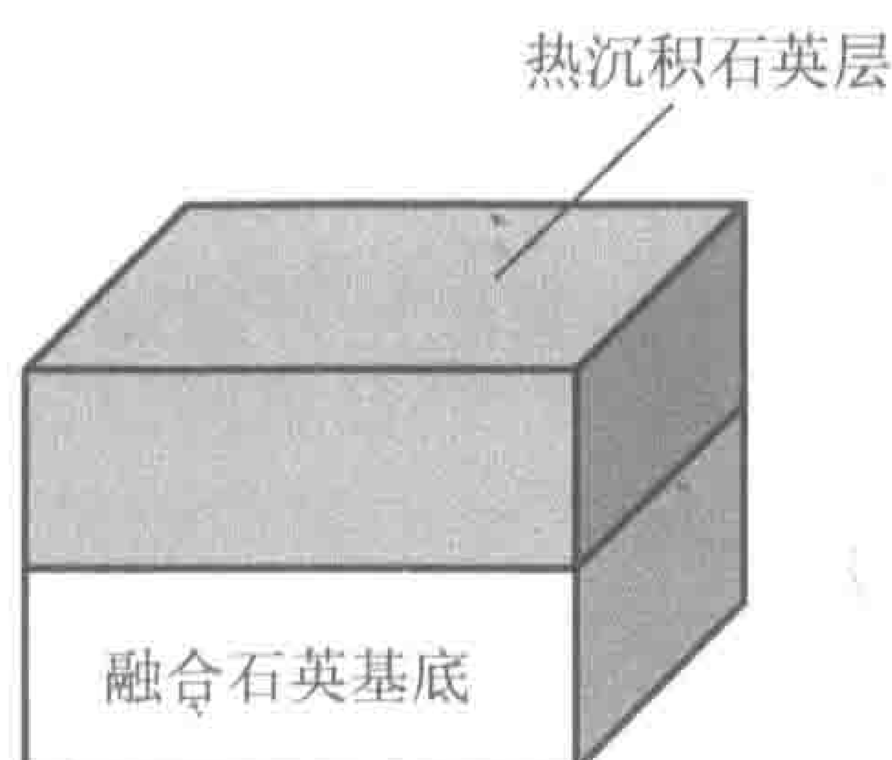
已证明银包被在石英基底规则形成间隔的亚微型柱是可靠的，但仍然是劳动密集型 SERS 基底。已用光刻技术来控制表面粗糙度，以适宜度测试 SERS 的电磁模型[77,78]。虽然这些表面产生 10^7 数量级的拉曼增强，但它们很难产生大的表面积。然而，一种替代的蚀刻方法，通过使用岛膜作为二氧化硅基底[79~83]上的蚀刻掩模产生石英柱，克服了这一限制。二氧化硅长椭圆球柱的制备是一个多步骤的操作，如图 12.2 所示。二氧化硅 500nm 层，首先由热蒸镀以 0.1～0.2nm/s 的速率熔融石英底座支撑。将所得的热沉积结晶石英在 950℃退火至熔融石英 45min。5nm 银层然后蒸发到热 SiO_2 层上，然后基底用闪光加热（500℃）20s，使薄的银层珠粒形成小球。随后当基板在 CHF_3 等离子体中蚀刻 30～60min 时，这些分离的银球就起到蚀刻掩模作用。这样的蚀刻产生银球亚微米二氧化硅扁长柱。由于熔凝石英的蚀刻速度远远低于热淀积石英，蚀刻过程形成了熔凝石英基底。然后将柱子清洗，以除去银蚀刻掩模并包被连续的 80nm 银层[83]或不连续层具有限定于石英柱前端的银沉积[80,81]。石英柱基底的缺点是制造柱困难，需要的蚀刻过程耗时。尽管如此，只要在使用之间替换银包被，优化的石英柱能够担当 SERS 基底重复使用的基础。

12.2.3.5　基于金属纳米颗粒嵌入式介质的 SERS 基底

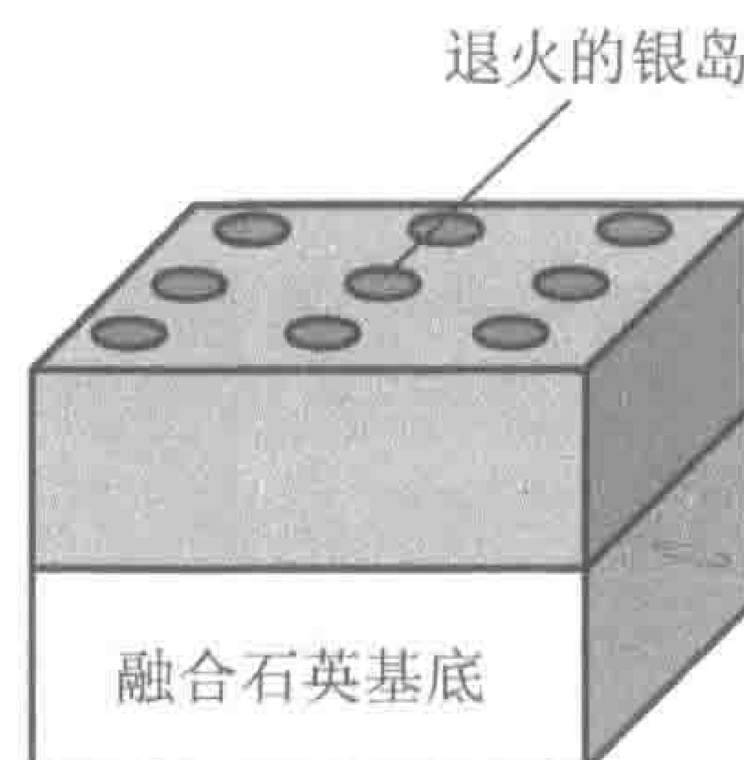
最近研究了嵌入在各种固体多孔介质的银纳米颗粒（图 12.1D），作为稳定的具有选择性检测潜力的 SERS 基底。在固体衬底中这些纳米粒子原位制备，提供了若干有利条件。例如，固体矩阵不但空间上稳定，而且物理上保护胶体。此外，这样的材料如溶胶-凝胶、乙酸纤维素凝胶和聚碳酸酯膜，能与嵌入的金属纳米颗粒的分析化合物相互作用。此外，通过简单的化学方法（特别是使用溶胶-凝胶技术时），控制孔径和基质极性而赋予其选择性。最后，通常用制备这种基底的化学方法，使 SERS 技术容易进入普通分析实验室。

通过分布在溶胶-凝胶基底的卤化银颗粒的化学还原，制备的银纳米颗粒包埋的溶胶-凝胶基体，已报道用于神经递质和多巴胺的检测[84,85]。通过硝酸银与三氯乙酸的反应，氯化银纳米粒子原位沉淀，要在整个溶胶-凝胶基质固化之前完成。在使用前，立即用氯化银粒子还原元素银纳米颗粒与 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$。这项技术的优点是，溶胶-凝胶可以非还原形式长时间保存，防止空气氧化的攻击。

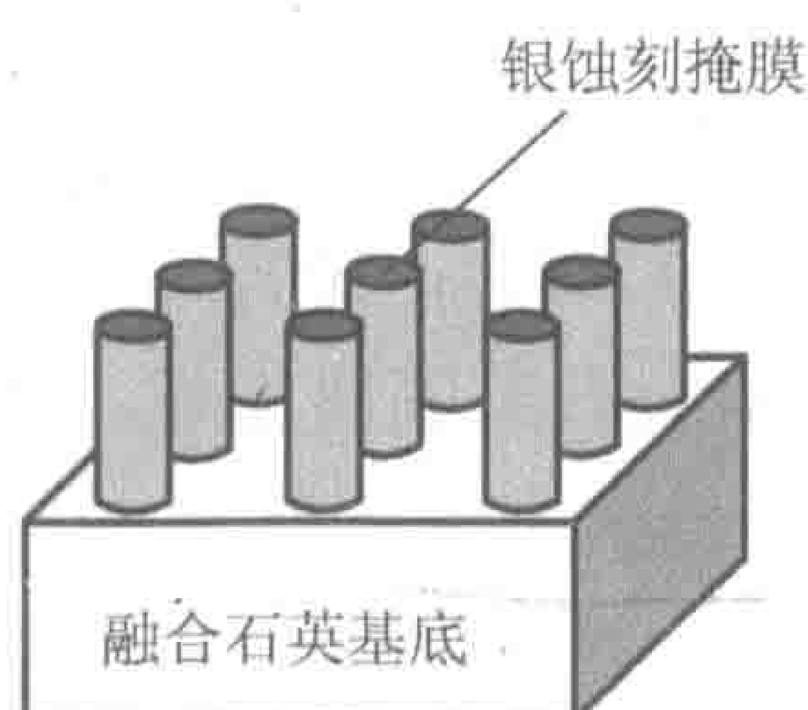
A 融合石英基底上石英热沉积后的情形



B 银岛膜沉积和退火后的情形



C 等离子蚀刻后的情形



D 银蚀刻掩膜除去之后

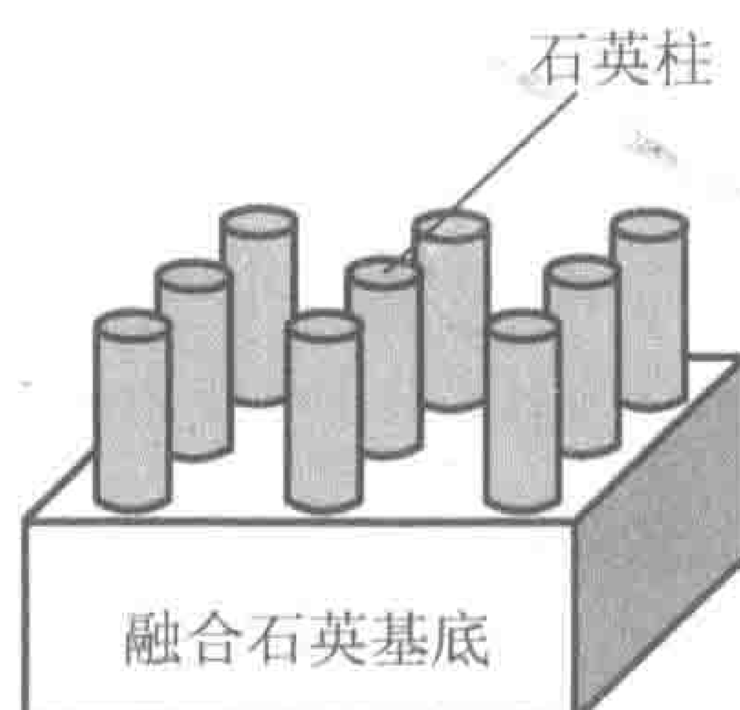


图 12.2　SERS 活性石英柱产生示意图：（A）熔融石英基底上石英热沉积后的情形；（B）银岛膜退火和沉积后示意图；（C）等离子蚀刻后示意图；（D）银蚀刻掩模除去之后示意图

12.2.4　在 SERS 基底上的外包被

12.2.4.1　一般有机物、金属和绝缘体外包被

聚合物涂料已应用于各种固体表面的 SERS 基底。在一项研究中，相对厚的多聚乙烯基吡咯烷酮（约 10μm）（PVP）层应用于氧化铝的银 SERS 基底[86]。除了延长保质期，这个方法证明，保持表面特征，对于 SERS 效应耐物理干扰极其重要。此外，经选择透过性赋予化学选择性，特别是对于具有氢结合性的化合物。将裸银 SERS 探针浸入 5%（*m*/*V*）聚合物的甲醇溶液中，随后室温下在水平面上固化大约 30min。PVP 涂层也被应用到银岛 SERS 探针选择性检测空气传播的化学物质[87,88]。在这些研究中[87,88]观察到涂层可保留的纤细的银岛膜超过 20 天。

聚苯并咪唑和巯基苯并咪唑的组合，已应用到活性 SERS 和硝酸蚀刻铜箔[89]。该涂层被确定为抑制腐蚀，从而延长了 SERS-活性基片的保质期。此外，治疗的银 SERS 基底与各种硫醇能够提供长期稳定性，即使基底储存在水中 1 个月[90]也很稳定。为了促进增强金属离子（Cu^{2+}、Pb^{2+}、Cd^{2+}）吸附，4-(2-吡啶偶氮)间苯二酚涂料已应用于 SERS 活性银[91]中。作为由反应性涂料中的复杂生物基质的分析，所提供的提高选择性的一个例子，通过将全血[92]直接进行 SERS 分析，在低于正常的治疗水平已检测到胆红素和水杨酸。在这项研究中，涂层、重盐的应用，排除了一种较不复杂的血清样品需要的耗时

和可能危险的准备。反应性涂料还提出了一步检测非法药物：安非他明和甲基苯丙胺[93]。

广泛的努力已致力于无机材料涂层的开发。例如，过渡金属（钯、铑、铂、铱、钌）已应用于金基板作为无孔针，超薄（2～3 个单层）薄膜，以提高一氧化碳和一氧化氮吸附的同时保留 SERS-诱导的底层金基底属性[94,95]。经过特殊电极沉淀过程来实现超薄涂层。还报道了二氧化硅包被的银岛系基底作为可行的 SERS 基底[96~98]。这些包被电介质的基底使溶液吸附染料定量检测成为可能。此外，他们已应用于基础分析吸附动力学研究。因为涂层良好定义的亲水性和稳定化性质，证明二氧化硅包被基底对于 SERS 的生物传感器特别有用。这样的基底可以抗氧化和抗物理损坏，因此两者均可延长保质期并提供再利用的可能性。

12.2.4.2　自组装单层外包被

自组装单层（SAM）已证明，在 SERS 基底开发和 SERS 的应用理论有重要价值。例如，它们已应用于平面载体上以高度有序的方式固定 SERS 活性金属胶体[99~102]。事实上，在暴露 SERS 活性胶体[101]之前，平面表面上通过自组装膜微接触打印，制备了特殊的胶体模式。自组装膜也被用于在对硝基苯酚[103]包被的银薄膜上，产生紫外诱导 SERS 活性的光感图案。在更多的基础研究中，自组装膜的固有的 SERS 信号，已被用于评价 SERS 探针表面，包括电化学粗糙金电极和固定化胶体金的表面均匀性[104]。自组装膜还允许应用于 SERS 基底表面选择性检测。例如，对胶体银基底上的碱性巯基乙酸的自组装膜，已经用于 SERS 选择性地吸附细胞色素 c[105]的检测，并已形成锚定捕捉 DNA 探针的 SERS 活性杂交平台[106]。也有报道银 SERS 基底上形成半胱胺单层[107,108]。这种单层可促进蛋白质的选择性吸附。

12.2.4.3　生物受体单层外包被

SERS 在生物诊断实验的潜在用途，已通过用生物受体包括寡核苷酸和抗体固定的单层所证明。表面增强拉曼基因（SERG）探针在医疗诊断中应用[109~113]在 12.4 节有非常详细介绍。在生产 SERG 探针中，通过聚合酶链反应（PCR）对特定的靶 DNA 序列进行扩增，染料标记的活性 SERS 可以附着到寡核苷酸引物上。PCR 后，将从感兴趣的靶 DNA 区域所得到的标记扩增子进行变性，让特定的、单链的、标记的 DNA 与寡核苷酸捕获的探针杂交，然后在固体载体上固定化。与 SERS 活性介质接触，允许 SERG 探针进行后续检测。此方法结合了通过 DNA 序列杂交所提供的固有的分子特异性，与 SERS 技术的高灵敏度。

抗体单层也一直是 SERS 用于分子选择性检测[114,115]的基础，从而表明 SERS 在免疫分析中的潜力。在一项研究中，Ni 等[115]证明了在单个夹心免疫分析中，使用两个报道分子同时检测两种抗原。靶抗原选择性捕获抗体与胶体金结合。捕获抗体包被的胶体，然后暴露于靶抗原的混合物。最后，报道靶抗体与固定化的靶抗原特异性结合而固定在胶体上。报道抗体上 SERS 活性标记允许超灵敏检测固定化抗原。每种抗原被分配一个不同的标记物，但因为各自的拉曼光谱很少重叠，两个报道抗体可以进行单一的检测。在另一项研究中，Dou 等[114]证明了无需报道分子进行 SERS 免疫测定法的潜力。相反，他们监测了吸附在金纳米颗粒的抗小鼠 IgG 抗体的天然 SERS 信号。由于拉曼散射的结

构特异性的性质，他们能够通过观察抗体谱变化的光谱特征的相对强度，直接确认缀合抗原。该测定中既不需要报道探针也不需要去除未结合的抗原漂洗步骤。

12.3 SERS 作为一种免疫分析读出方式

人们对免疫分析有相当大兴趣，已超过了十年。例如，在 1989 年，Rohr 等[116]报道了 SERS 免疫测定的一个早期例子。同年，Grabbe 和 Buck [117]报道了本地人 Ig-G 的 SERS 研究。最近，通过观察天然抗体的 SERS 光谱的变化，确定抗体与靶抗原结合的简要免疫测定，获得了天然抗体的 SERS 信号[114]。

另一种方案是，用报道抗体探针与 SERS 活性化合物或用酶与底物反应的产生 SERS 活性产物来获得极其敏感的检测。这些方法往往涉及三明治夹心免疫分析技术，该技术增加所需的步骤，但提供高灵敏度的优势和“标签复用”的潜力。例如，Ni 等[115]最近报道，在单一分析中利用两个报道抗体，同时检测两种类型的抗原。报道探针的标记，以最小的重叠产生 SERS 光谱特征，使标签多重优势得以发挥。在三明治夹心测定模式中，一组抗体与金胶体上的靶抗原固定化，而报道抗体探针随后被固定在该靶抗原的别构位点。

在其他研究中，报道抗体已用过氧化物酶标记[118,119]。一旦过氧化物酶标记的抗原被固定到靶上，它就可以与底物、邻苯二胺和过氧化氢接触。酶与多种底物分子持续反应，产生极高产率的 SERS 活性产物偶氮苯胺。因此，这种方法迄今仅限于三明治夹心免疫测定。例如，在细胞中一项检测膜结合酶的研究中，细胞首先遇到对膜结合酶初级抗体特异性，然后接触对过氧化物酶标记的报道抗体对初级抗体特异性[118]。也有报道，使用固定化靶抗原捕获抗体，以及报道抗体与固定化靶抗原的不同抗原位点结合[119]。

最近，用金纳米壳成功检测了盐水、血清和全血中的免疫球蛋白[120]。这个系统构成了简单免疫测定，在 10～30min，能检测不同介质中，每毫升各种分析物低于毫微克量的样品。Mulvaney 等[121]也报道了创新性的结果，他们制备“玻璃-包被的，分析物-标记的”纳米颗粒，用于多重生物分析。最近，Doering 和 Ni [122]还报道了一种改进的类核-壳胶体纳米粒子，这些粒子有高效的 SERS，并适合多路检测和单粒子水平的光谱学。核-壳结构包含光学增强金属芯、报道分子光谱特征和一个便于保护和偶联的包埋二氧化硅壳。具有优化金核和二氧化硅壳差不多的性能，核-壳纳米颗粒在水性电解质和有机溶剂中均稳定，产生强烈的单粒子 SERS 光谱[122]。

12.4 表面增强拉曼散射（SERS）基因探针

人们对发展基因组分析中的光学技术如在生物医学诊断、病原体检测、基因鉴定、基因作图和 DNA 测序使用的非放射性 DNA 探针有了极大的兴趣。核酸探针与 DNA 生

物靶（如基因序列、细菌、病毒 DNA）的杂交，使得在确定 DNA 序列互补的探针具有非常高的精确度。20 世纪 80 年代的几项研究证明，采用 SERS 可能微量检测 DNA 碱基和寡核苷酸[123~126]。最近，用拉曼和（或）SERS 标记能极为敏感地检测 DNA 的可能性得到了肯定。例如，Graham 等[113]宣称通过表面增强共振拉曼散射（SERRS），对单分子 DNA 检测有足够的灵敏度。由于使用标记的 DNA 作为基因探针，SERS 技术最近已应用到人类免疫缺陷病毒[112]及 B 淋巴细胞瘤 2 基因[110] DNA 片段的检测。

测序人类全基因组的一个关键方面，涉及定义和识别对应于人类基因组特异性区域的 DNA 大插入克隆子。一个便于大规模基因组测序的方案，涉及开发人染色体作图进入基于细菌大插入克隆的作图，如细菌人工染色体（BAC）[127~129]。一种特别有吸引力的省时方法，检测多重人工染色体克隆标记探针可同时对 BAC 法基因组测序和作图。SERS 技术能够提供多重标记的能力。本节介绍，SERS 基因探针排除了放射性标记物的需要，同时有很大的潜力为 DNA 测序及临床分析提供高灵敏、选择性强和多重标记。

图 12.3 为用单点 SERS 光谱记录检测系统示意图。单点可能对应杂交平台的一个微点。该系统可以容易地使用商购的或现成的部件组装而成。焦点是，用低功率的激光束来激发杂交平台上的单点。在我们的研究中，用氦氖激光器提供 632.8nm 大约 5mW 激发电源。带通滤波器是用于样品激发之前分离 632.8nm 的元件。信号采集光学模块用于收集 180℃的与入射激光束增值有关的 SERS 信号。收集模块包括拉曼全息滤光器，在进入收集光纤之前，它排斥瑞利散射辐射。最后，将收集光纤耦合到光谱仪（仪器 S4 公司，新泽西州 Edison，HR-320），它配备有普林斯顿，新泽西州特伦顿，RE-ICCD-576S，红色增强强化电荷耦合器 RE-ICCD（纳米级超高速相机）-检测系统。信号采集模块可绕过光纤直接耦合到光谱仪。然而，光纤大大简化的测量和通过最小化关键光学排列步骤提高了再现性。

因为 SERS 基因探针杂交平台由一个二维（2D）DNA 杂交点阵列组成，用于从所有点同时记录信号的方法对于减少分析时间、排除需要的平台扫描非常有利。对于 SERS 基于基因探针的分析，这种技术可以通过多光谱成像（MSI）来实现。多光谱成像的原理如图 12.4 所示。常规成像，来自图像的每个像素的光发射没有调谐波长的选择（图 12.4A）能力。用常规的光谱，在光谱范围内的每个波长的信号可以被记录，但仅仅记录单个分析物的位点。这个条件是基于前一段单点分析系统的描述。多光谱成像（图 12.4C）结合了这两个记录方式，从而允许采集拉曼光谱用于测定平台上的每个杂交点，提供包括观察仪器在内的整个平台。这一概念的成功关键是成像光谱仪（图 12.5）。在我们的研究中，快速扫描固态器和一个声光可调谐滤波器（AOTF）应用于拥有图像显示能力的可调波长选择。这种紧凑的固态设备具有 450～700nm 有效波长范围，拥有 2Å 光谱分辨率和 70%的衍射效率。通过可调谐射频信号供给声光可调谐滤波器，简单地实现波长调谐。

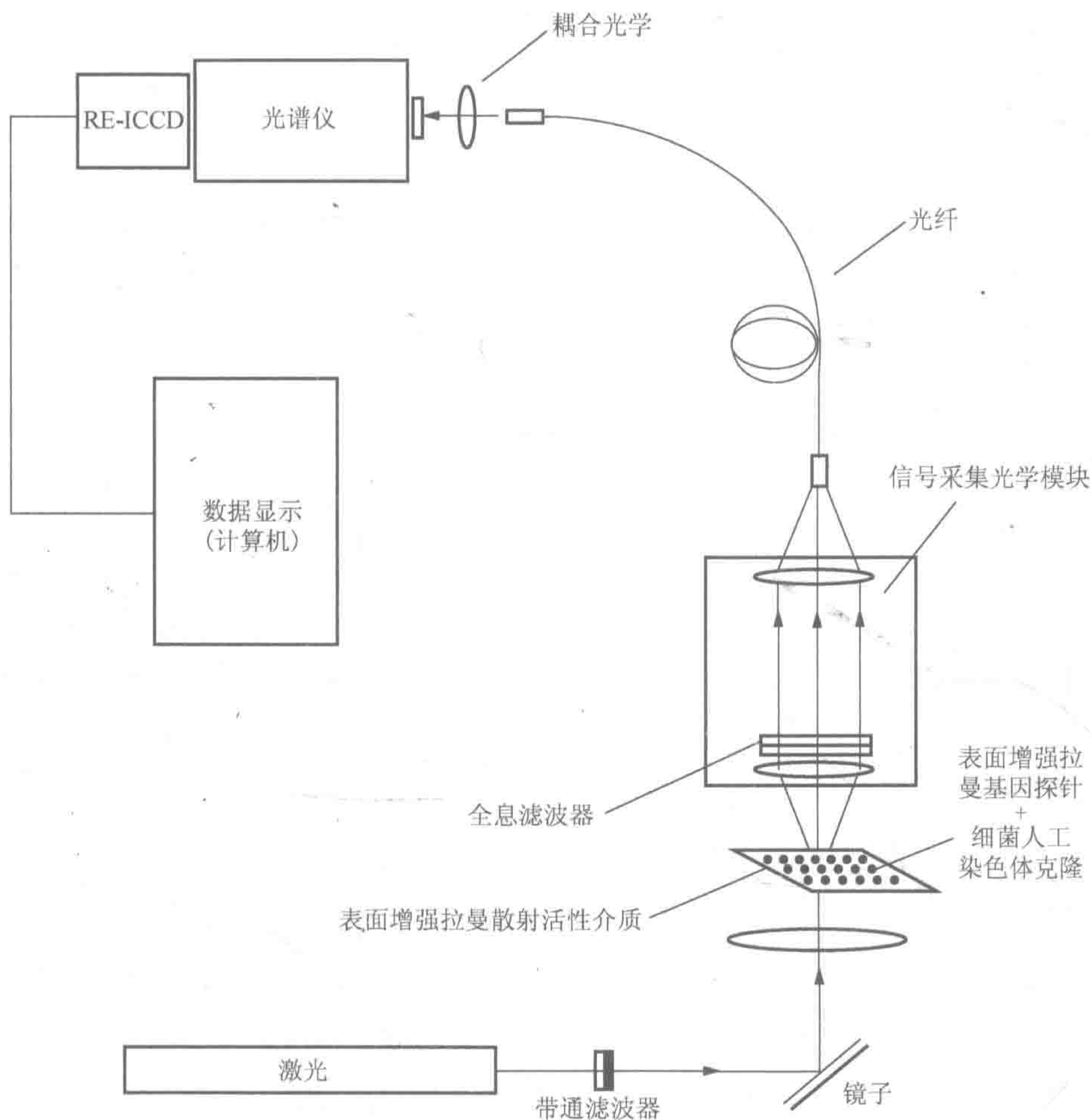


图 12.3　仪器设置从生物分析平台个别点光谱采集。RE-ICCD 为红色增强强化电荷耦合器

在我们的实验室最近开发了一种 SERS 活性的 DNA 杂交平台，极大地增强了 SERS 基因探针技术的效用[106]。在以往的工作中，标记的 DNA 探针杂交是在传统的商用平台（如 DNA 结合板）上完成的，随后平台经 SERS 激活[24,112]。为了使 SERS 基因探针技术更实用，我们开发了一种天然的 SERS 活性杂交平台[106]。分析无需 SERS 活化跟着进行杂交步骤。新的 DNA 分析平台直接将寡核苷酸的捕获探针阵列，固定在制备玻璃的银岛衬底上。捕获探针经由烷基硫醇的自组装单层膜反应，直接锚定到银表面。偶联方法包括羧酸（固定化巯基十一酸）与不稳定基团在温和条件下酯化；*N*-羟基琥珀酰亚胺（NHS）衍生物与 5′胺-标记的 DNA 捕获探针的进一步反应，产生稳定的酰胺[130]。我们最近的研究证明了这种技术，在癌症基因检测（高共显乳腺癌易感基因和抗 B 淋巴细胞瘤/白血病-2 抑制肿瘤细胞凋亡基因 *BRCA1* 和 *BAX*）中的潜力[106]。

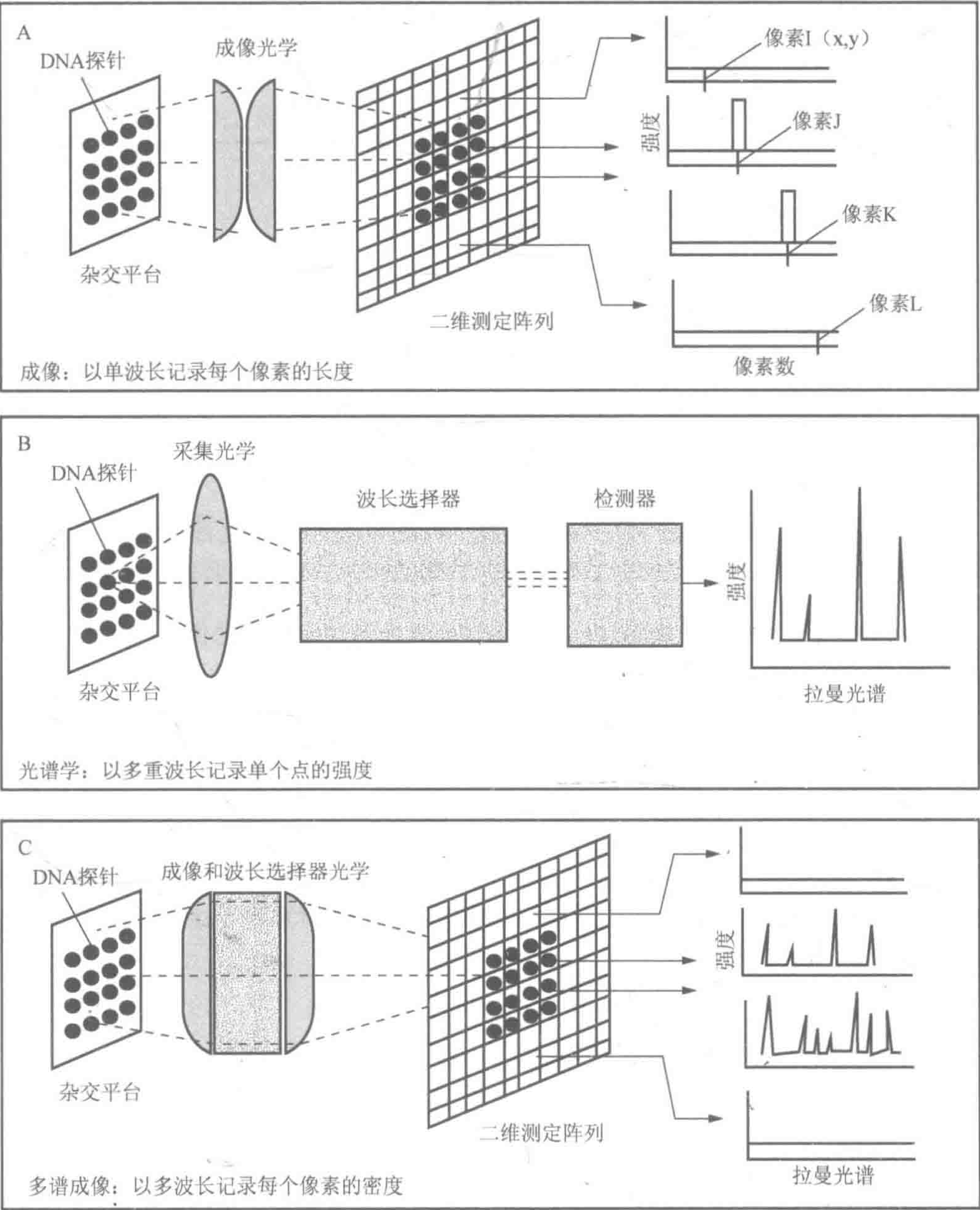


图 12.4　生物检测平台数据采集的各种模式：（A）成像；（B）光谱；（C）MSI

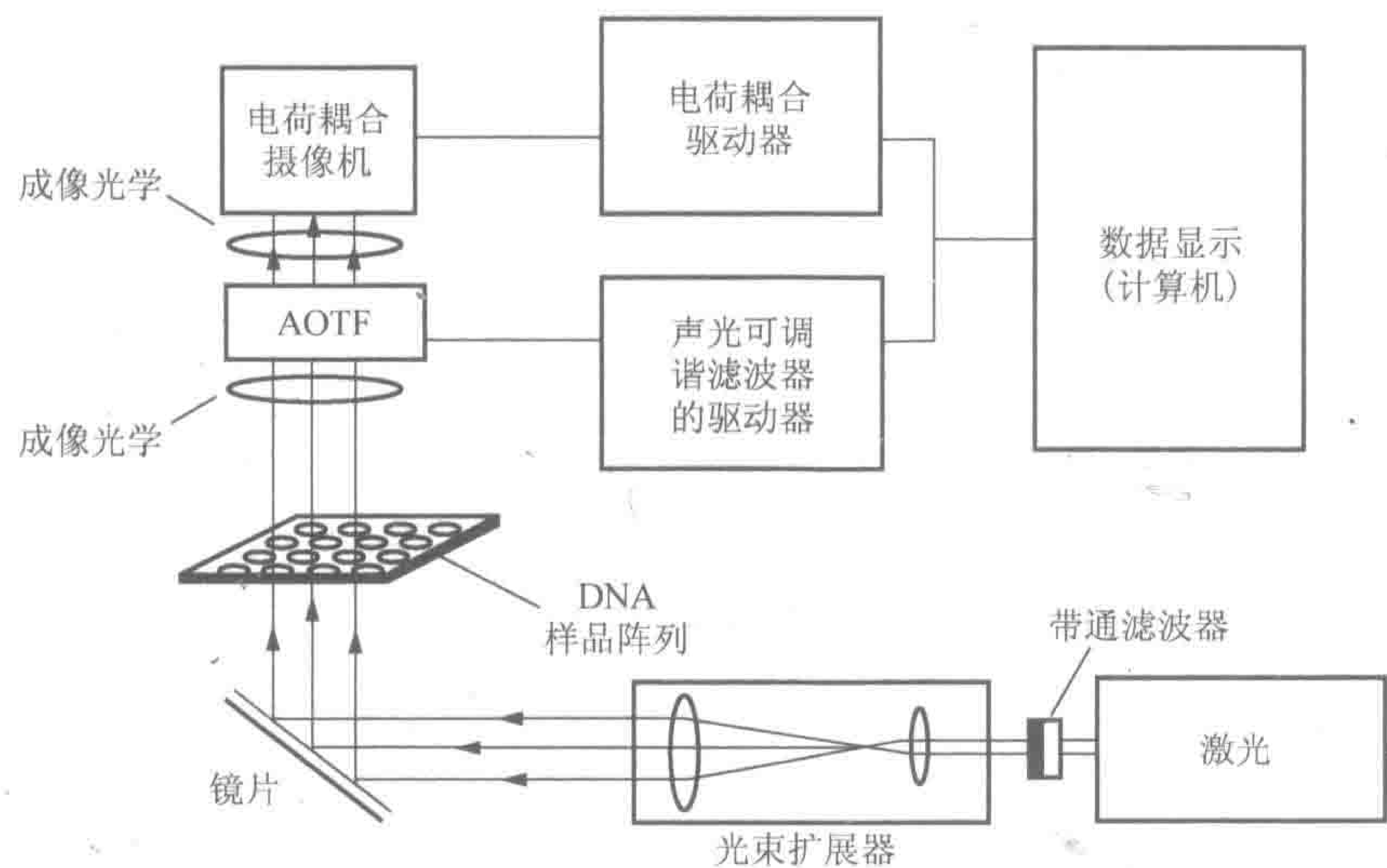


图 12.5　用于生物检测平台多光谱成像仪示意图。CCD 为电荷耦合器

12.5　近场扫描光学显微技术表面增强拉曼散射探针

近场扫描光学显微镜（NSOM）是用常规光学分光光度技术提供光谱信息，获得亚波长分辨率（20～200nm）的技术[131,132]。NSOM 的高空间分辨率使得高密度系统，如在体内实验偶遇的个别生物分子，能进行光谱研究[8,133,134]。在这方面，NSOM 与拉曼显微镜的结合特别诱人。到目前为止，这种新颖的扫描探针技术，仅限制于荧光和发光光谱分析。表面增强拉曼散射和锥形单模光纤探针的使用，从激发强度低至 10nW 的单一银纳米颗粒中，获得了近场拉曼光谱[135]。最近报道称，NSOM 和 SERS 的组合，获得了亚波长横向分辨率的频谱、空间和分子吸附化学的信息[8,9]。在银基底电极上获得了焦油坚牢紫和罗丹明 6G 近场 SERS 光谱。能够记录约 10 个银纳米颗粒上少于 300 个分子或小于 10^{-2} 单层吸附的光谱。

12.6　表面增强拉曼散射作为单分子检测的工具

近几年出现了用表面增强拉曼散射（SERS）检测单分子的若干报道[4～7,113,136,137]。在这些里程碑式研究的一个关键因素是优异的 SERS 基底的开发。大多数单分子 SERS 检测的报道，都涉及悬浮液中使用金属胶体。例如，Kneipp 等证明，银[5,6]和胶体悬浮液中结晶紫单分子的检波[7]。在这些研究中，观察到约 $10^{-16}cm^2$/分子的有效横截面，与 10^{14} 个增强因子相一致。金纳米颗粒市场上可以买到，但需要通过添加氯化钠凝聚。这些结果非常有前途，因为这些花青染料可以用作生物分析的标记物。

在某些情况下，除了受益于 SERS 外，还能够共振增强生物检测标记物。例如，DNA 标记：2,5,1′,3′,7′,9′-六氯-6-羧基荧光素（HEX），已用于银胶体悬浮液中 SERRS，获得了

单分子检波[113]。还观察到 8×10^{-13}mol/L 的 DNA 的 HEX 信号，这相当于任何一次测定所需要的体积，每次探测小于 1 个分子。单分子检波也已在平面表面衬底上得到证明。例如，固定在聚赖氨酸包被的玻璃表面的银胶体上，已观察到罗丹明 6G 分子增强了 10^{14}～10^{15} 个因子[4]。同样报道了吸附在固定化聚合物包被硅晶片[136]上银纳米颗粒的血红蛋白分子 10^{14}～10^{15} 因子增强。然而，在这项研究中，研究人员发现，只有血红蛋白分子处于银纳米颗粒之间才能观察到单分子检波。

12.7　表面增强拉曼散射纳米探针的细胞内分析

直接观察活细胞内单分子和单分子事件，能令人瞩目地增进我们对基本细胞程序（如信号转导和基因转录），以及治疗剂（如反义 RNA 和基因治疗载体）在细胞内输送和轨迹等知识的理解[106,138]。因此，通常重要的是，开发具有时空分辨率，测量活细胞内单个分子反应的技术[139]。

在我们的实验室，我们正在开发的战略目标是将 SERS 活性金属胶体靶向到单个细胞[140]。图 12.6 显示表面化学涉及的过程。将拉曼活性标记物[如对-氨基苯甲酸（PABA）]和通用接头（如链霉亲和素）共价连接到烷基硫醇改性的金表面，经由 *N*-羟基酯中间体

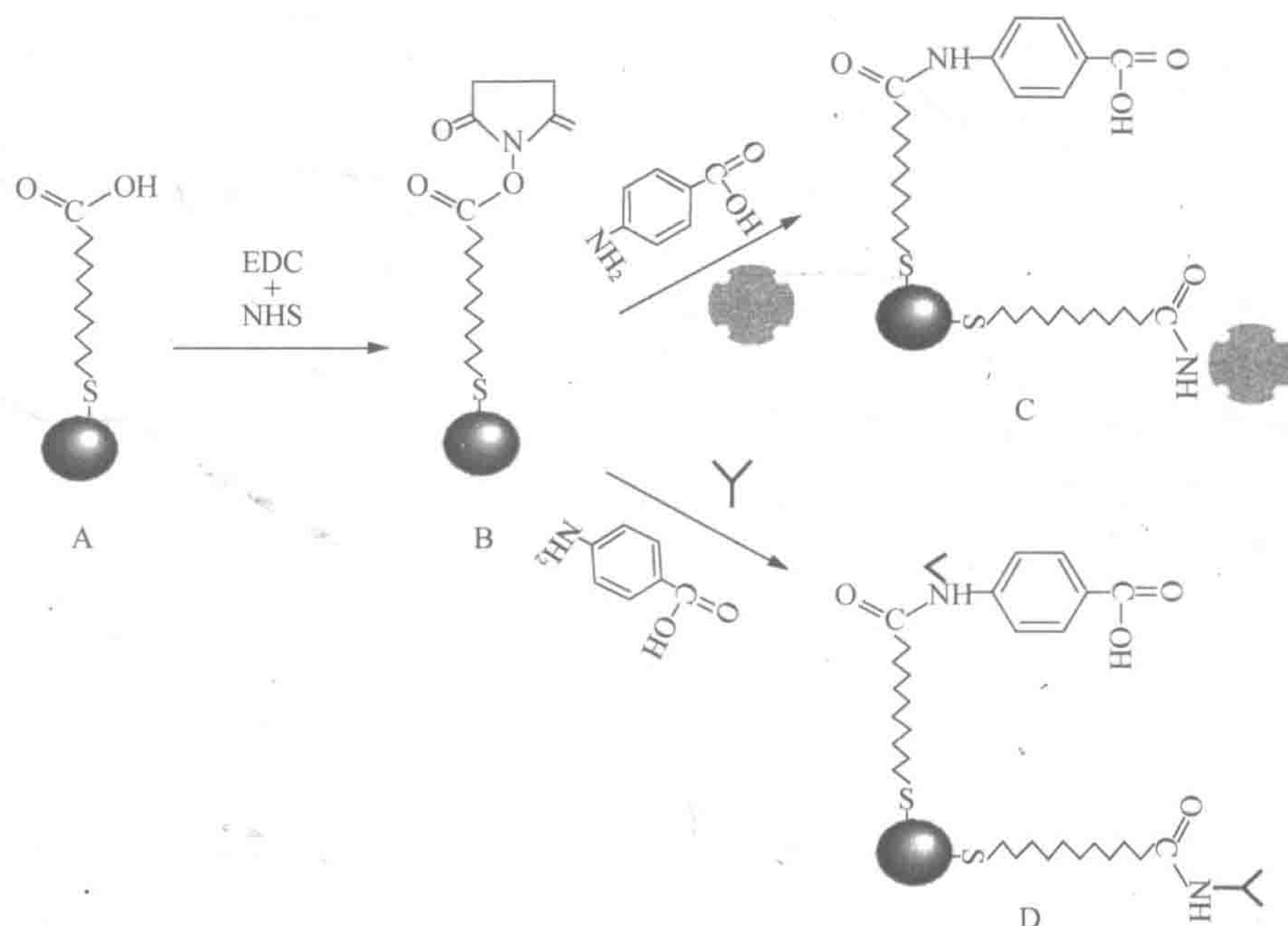


图 12.6　SERS 活性金属纳米粒子双标签的化学。(A)金属纳米粒子表面上形成的巯基十一烷酸（MUA）自组织单层；（B）通过碳二亚胺，*N*-(3-二甲基氨基丙基)-*N′*-乙基碳二亚胺（EDC）活化 MUA 羧酸基团，用 *N*-羟基琥珀酰亚胺（NHS）形成 *N*-羟基琥珀酰亚胺酯；（C，D）拉曼标记物与链霉亲和素或含氨基的生物分子（如抗体）的结合和随后的反应活化中间体

形成酰胺键。通过（链霉）亲和素-生物素的相互作用，许多含氨基的生物分子的衍生作用保留对氨基苯甲酸的游离羧基，各种商品生物素化生物分子（如抗体、肽和核苷酸），也允许保留没有链霉亲和素结合位点。因此，在相同的 SERS 活性金属纳米粒子的双标记，为银/金纳米颗粒功能化提供了一个通用模式。考虑到 SERS 的高灵敏度和表面改性方案有很大的灵活性，认为该方法能够在许多生物分子系统，特别是在单活细胞内分析找到广泛的应用途径。

使用 60nm 的金颗粒，测量单个活细胞天然组分的 SERS 可行性，最近得到了证实[139]，其中，用 1μm 横向分辨率在细胞单层的 SERS 作图，在几乎所有地方显示出不同的拉曼光谱，反映了细胞的高度非均质化学组织。为了鉴定单细胞内单分子水平细胞成分，很显然许多参数，如激发波长、纳米颗粒尺寸和聚集的状态仍然需要进行优化。

12.8　结　　论

可靠表面增强拉曼散射活性金属纳米结构的发展，对刺激拉曼散射作为生物分析实用分析工具产生了新的兴趣。由于 SERS 增强主要来源电磁，有可能实现每个分子更强的 SERS 效应。直到这些发展得以实现，原来对拉曼散射分析的兴趣不大，因为正常拉曼散射的横截面是微不足道的（$10^{-30}cm^2$/分子），相当于穿过其他分子光谱，特别是冷光的横截面。在过去，用高功率激光来弥补这一缺陷。但是，此过程限制了有效性，主要是因为它引起探针分子光分解而减少，特别是痕量浓度更是如此。相比之下，SERS 诱导媒体能够痕量检测相对较低的激光功率。

现在正在使用液相与固体 SERS 诱导介质，检测生物重要化合物；此外，正在发明应用于生物医学的 SERS 技术，如基因探针。这种衬底的发展及其在实际分析应用的使用，还需要战胜生产纳米结构的重现性和成本效益方面的艰巨挑战。最近努力的一个显著方向是致力于研究 SERS 包被以提高选择性、寿命和耐用。预计随着目前 SERS 活性纳米结构的发展，将在生物应用如原位细胞的监测和传感方面继续提供令人振奋的机会。

致谢

本项工作得到了美国联邦调查局（项目编号 2051-II18-Y1）、美国能源部生物和环境研究办公室，并与下属的 UT-Battelle 责任有限公司签订了合同 DE-AC05-00OR22725、橡树岭国家实验室指导研究和发展项目（先进等离子传感器项目）的共同赞助。Fei Fan 和 David L. Stokes 受到橡树岭国家实验室博士后研究助理计划指定赞助，橡树岭国家实验室和橡树岭科学与教育研究所共同参与管理。

参考文献

[1] Fleischmann, M., Hendra, P. J., and McQuillan, A. J. (1974) Raman-spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem. Phys. Lett.* 26, 163–166.

[2] Jeanmaire, D. L. and Van Duyne, R. P. (1977) Surface Raman spectro-electrochemistry. 1. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic-amines adsorbed on anodized silver electrode. *J. Electroanal. Chem.* 84, 1–20.

[3] Albrecht, M. G. and Creighton, J. A. (1977) Anomalously intense Raman-spectra of pyridine at a silver electrode. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 5215–5217.

[4] Nie, S. M. and Emory, S. R. (1997) Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science* 275, 1102–1106.

[5] Kneipp, K., Wang, Y., Kneipp, H., Perelman, L. T., Itzkan, I., Dasari, R., and Feld, M. S. (1997) Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Phys. Rev. Lett.* 78, 1667–1670.

[6] Kneipp, K., Kneipp, H., Deinum, G., Itzkan, I., Dasari, R. R., and Feld, M. S. (1998) Single-molecule detection of a cyanine dye in silver colloidal solution using near-infrared surface-enhanced Raman scattering. *Appl. Spectrosc.* 52, 175–178.

[7] Kneipp, K., Kneipp, H., Manoharan, R., Hanlon, E. B., Itzkan, I., Dasari, R. R., and Feld, M. S. (1998) Extremely large enhancement factors in surface-enhanced Raman scattering for molecules on colloidal gold clusters. *Appl. Spectrosc.* 52, 1493–1497.

[8] Deckert, V., Zeisel, D., Zenobi, R., and Vo-Dinh, T. (1998) Near-field surface enhanced Raman imaging of dye-labeled DNA with 100-nm resolution. *Anal. Chem.* 70, 2646–2650.

[9] Zeisel, D., Deckert, V., Zenobi, R., and Vo-Dinh, T. (1998) Near-field surface-enhanced Raman spectroscopy of dye molecules adsorbed on silver island films. *Chem. Phys. Lett.* 283, 381–385.

[10] Moskovits, M. (1985) Surface-enhanced spectroscopy. *Rev. Mod. Phys.* 57, 783–826.

[11] Wokaun, A. (1984) Surface-enhanced electromagnetic processes. *Solid State* Phys. Adv. Res. Applic. 38, 223–294.

[12] Schatz, G.C. (1984) Theoretical-studies of surface enhanced Raman-scattering. *Acc. Chem. Res.* 17, 370–376.

[13] Kerker, M. (1984) Electromagnetic model for surface-enhanced Raman-scattering (Sers) on metal colloids. *Acc. Chem. Res.* 17, 271–277.

[14] Chang, R. K. and Furtak, T. E. (1982) *Surface Enhanced Raman Scattering*, Plenum, New York.

[15] Garrell, R. L. (1989) Surface-enhanced Raman-spectroscopy. *Anal. Chem.* 61, 401A–411A.

[16] Vo-Dinh, T. (1989) Surface-enhanced Raman spectrometry, in *ChemicalAnalysis of Polycyclic Aromatic Compounds* (Vo-Dinh, T., ed.), Wiley, New York, pp. 451–482.

[17] Pemberton, J. E. (1991) in *Electrochemical interfaces: modern techniques for in-situ characterization* (Abruna, H. D., ed.), VCH Publishers, Inc.: New York, pp. 195–256.

[18] Brandt, E. S. and Cotton, T. M. (1993) Surface-enhanced Raman scattering. In Investigations of Surfaces and Interfaces Part B, Physical Methods of Chemistry Series, 2nd ed., Rossiter, B. W., (Baetzold, R. C., eds.), Wiley, New York, pp. 663–718.

[19] Otto, A., Mrozek, I., Grabhorn, H., and Akemann, W. (1992) Surface-enhanced Raman-scattering. *J. Phys. Condensed Matter* 4, 1143–1212.

[20] Vo-Dinh, T. (1995) Surface-enhanced Raman spectroscopy, in *Photonic Probes of Surfaces* (Halevi, P., ed.), Elsevier, New York, pp. 65–96.

[21] Ruperez, A. and Laserna, J. J. (1996) Surface-enhanced Raman spectroscopy, in *Modern Techniques in Raman Spectroscopy* (Laserna, J. J., ed.), Wiley, New York, pp. 227–264.

[22] Haller, K. L., Bumm, L. A., Altkorn, R. I., Zeman, E. J., Schatz, G. C., and Vanduyne, R. P. (1989) Spatially resolved surface enhanced 2nd harmonic-generation-theoretical and experimental-evidence for electromagnetic enhancement in

the near-infrared on a laser microfabricated Pt surface. *J. Chem. Phys.* 90, 1237–1252.

[23] Golab, J. T., Sprague, J. R., Carron, K. T., Schatz, G. C., and Van Duyne, R. P. (1988) A surface enhanced hyper-Raman scattering study of pyridine adsorbed onto silver—experiment and theory. *J. Chem. Phys.* 88, 7942–7951.

[24] Vo-Dinh, T., Stokes, D. L., Griffin, G. D., Volkan, M., Kim, U. J., andSimon, M. I. (1999) Surface-enhanced Raman scattering (SERS) method and instru- mentation for genomics and biomedical analysis. *J. Raman Spectrosc.* 30, 785–793.

[25] Nabiev, I. and Manfait, M. (1993) Industrial applications of the surface-enhanced Raman-spectroscopy. *Rev. Inst. Francais Petrole* 48, 261–285.

[26] Nabiev, I., Chourpa, I., and Manfait, M. (1994) Applications of Raman and surface-enhanced Raman-scattering spectroscopy in medicine. *J. Raman Spectrosc.* 25, 13–23.

[27] Kneipp, K., Kneipp, H., Itzkan, I., Dasari, R. R., and Feld, M. S. (1999) Surface-enhanced Raman scattering: a new tool for biomedical spectroscopy. *Curr. Sci.* 77, 915–924.

[28] Koglin, E. and Sequaris J. M. (1986) Surface enhanced Raman-scattering of biomolecules. *Top. Curr. Chem.* 134, 1–57.

[29] Pemberton, J. E. and Buck, R. P. (1981) Detection of low concentrations of a colored adsorbate at silver by surface-enhanced and resonance-enhanced Raman spectrometry. *Anal. Chem.* 53, 2263–2267.

[30] Pettinger, B., Wenning, U., and Wetzel, H. (1980) Surface-plasmon enhanced Raman-scattering frequency and angular resonance of Raman scattered-light from pyridine on Au, Ag and Cu electrodes. *Surf. Sci.* 101, 409–416.

[31] Loo, B. H. (1983) Surface-enhanced Raman-spectroscopy of platinum. 2. Enhanced light-scattering of chlorine adsorbed on platinum. *J. Phys. Chem.* 87, 3003–3007.

[32] Fleischmann, M., Graves, P. R., and Robinson, J. (1985) The Raman-spectroscopy of the ferricyanide ferrocyanide system at gold, beta-palladium hydride and platinum-electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 182, 87–98.

[33] Carrabba, M. M., Edmonds, R. B., and Rauh, R. D. (1987) Feasibility studies for the detection of organic-surface and subsurface water contaminants by surface-enhanced Raman-spectroscopy on silver electrodes. *Anal. Chem.* 59, 2559–2563.

[34] Ren, B., Lin, X. F., Yang, Z. L., Liu, G. K., Aroca, R. F., Mao, B. W., and Tian, Z. Q. (2003) Surface-enhanced Raman scattering in the ultraviolet spectral region: UV-SERS on rhodium and ruthenium electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 9598, 9599.

[35] Yang, Z. L., Wu, D. Y., Yao, J. L., Hu, J. Q., Ren, B., Zhou, H. G., andTian, Z. Q. (2002) SERS mechanism of nickel electrode. *Chin. Sci. Bull.* 47, 1983–1986.

[36] Tian, Z. Q., Ren, B., and Wu, D. Y. (2002) Surface-enhanced Raman scattering: from noble to transition metals and from rough surfaces to ordered nanostructures. *J. Phys. Chem. B* 106, 9463–9483.

[37] Thierry, D. and Leygraf, C. (1985) The influence of photoalteration on surface-enhanced Raman-scattering from copper electrodes. *Surf. Sci.* 149, 592–600.

[38] Creighton, J. A., Blatchford, C. B., and Albrecht, M. C. (1979) Plasma resonance enhancement of Raman-scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *J. Chem. Soc. Fara- day Trans.* 2, 790–798.

[39] Sheng, R. S., Zhu, L., and Morris, M. D. (1986) Sedimentation classification of silver colloids for surface-enhanced Raman-scattering. *Anal. Chem.* 58, 1116–1119.

[40] 40. Ni, F., Sheng, R. S., and Cotton, T. M. (1990) Flow-injection analysis and real-time detection of RNA bases by surface-enhanced Raman-spectroscopy. Anal. Chem. 62, 1958–1963.

[41] Lee, P. C. and Meisel, D. (1982) Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J. Phys. Chem.* 86, 3391–3395.

[42] Munro, C. H., Smith, W. E., Garner, M., Clarkson, J., and White, P. C. (1995) Characterization of the surface of a citrate-reduced colloid optimized for use as a substrate for surface-enhanced resonance Raman-scattering. *Langmuir* 11, 3712–3720.

[43] Tarabara, V. V., Nabiev, I. R., and Feofanov, A. V. (1998) Surface-enhanced Raman scattering (SERS) study of

mercaptoethanol monolayer assemblies on silver citrate hydrosol: preparation and characterization of modified hydrosol as a SERS-active substrate. *Langmuir* 14, 1092–1098.

[44] Li, Y. S., Cheng, J. C., and Coons, L. B. (1999) A silver solution for surface-enhanced Raman scattering. *Spectrochim. Acta Part A* 55, 1197–1207.

[45] Ahern, A. M. and Garrell, R. L. (1987) In situ photoreduced silver-nitrate as a substrate for surface-enhanced Raman-spectroscopy. *Anal. Chem.* 59, 2813– 2816.

[46] Prochazka, M., Mojzes, P., Stepanek, J., Vlckova, B., and Turpin, P. Y. (1997) Probing applications of laser ablated Ag colloids in SERS spectroscopy: improvement of ablation procedure and SERS spectral testing. *Anal. Chem.* 69, 5103–5108.

[47] Hildebrandt, P. and Stockburger, M. (1984) Surface-enhanced resonance Raman-spectroscopy of rhodamine-6G adsorbed on colloidal silver. *J. Phys. Chem.* 88, 5935–5944.

[48] Cao, Y. W., Jin, R., and Mirkin, C. A. (2001) DNA-modified core-shell Ag/Au nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 7961, 7962.

[49] Pham, T., Jackson, J. B., Halas, N. J., and Lee, T. R. (2002) Preparation and characterization of gold nanoshells coated with self-assembled monolayers. *Langmuir* 18, 4915–4920.

[50] Graf, C. and van Blaaderen, A. (2002) Metallodielectric colloidal core-shell particles for photonic applications. *Langmuir* 18, 524–534.

[51] Jackson, J. B., Westcott, S. L., Hirsch, L. R., West, J. L., and Halas, N. J. (2003) Controlling the surface enhanced Raman effect via the nanoshell geometry. *Appl. Phys. Lett.* 82, 257–259.

[52] Van Duyne, R. P., Hulteen, J. C., and Treichel, D. A. (1993) Atomic-force microscopy and surface-enhanced Raman-spectroscopy. 1. Ag island films and Ag film over polymer nanosphere surfaces supported on glass. *J. Chem. Phys.* 99, 2101–2115.

[53] Semin, D. J. and Rowlen, K. L. (1994) Influence of vapor-deposition parameters on SERS active Ag film morphology and optical-properties. *Anal. Chem.* 66, 4324–4331.

[54] Stockle, R. M., Deckert, V., Fokas, C., Zeisel, D., and Zenobi, R. (2000) Sub-wavelength Raman spectroscopy on isolated silver islands. *Vibrational Spectrosc.* 22, 39–48.

[55] Roark, S. E. and Rowlen, K. L. (1994) Thin Ag Films—influence of substrate and postdeposition treatment on morphology and optical-properties. *Anal. Chem.* 66, 261–270.

[56] Roark, S. E., Semin, D. J., Lo, A., Skodje, R. T., and Rowlen, K. L. (1995) Solvent-induced morphology changes in thin silver films. *Anal. Chim. Acta* 307, 341–353.

[57] Mosier-Boss, P. A. and Lieberman, S. H. (1999) Comparison of three methods to improve adherence of thin gold films to glass substrates and their effect on the SERS response. *Appl. Spectrosc.* 53, 862–873.

[58] Vo-Dinh, T., Hiromoto, M. Y. K., Begun, G. M., and Moody, R. L. (1984) Surface-enhanced Raman spectrometry for trace organic-analysis. *Anal. Chem.* 56, 1667–1670.

[59] Goudonnet, J. P., Begun, G. M., and Arakawa, E. T. (1982) Surface-enhanced Raman-scattering on silver-coated Teflon sphere substrates. *Chem. Phys. Lett.* 92, 197–201.

[60] Alak, A. M. and Vo-Dinh, T. (1989) Silver-coated fumed silica as a substrate material for surface-enhanced Raman-scattering. *Anal. Chem.* 61, 656–660.

[61] Moody, R. L., Vo-Dinh, T., and Fletcher, W. H. (1987) Investigation of experimental parameters for surface-enhanced Raman-scattering (SERS) using silver-coated microsphere substrates. *Appl. Spectrosc.* 41, 966–970.

[62] Alak, A. M. and Vo-Dinh, T. (1988) Surface-enhanced Raman spectrometry of chlorinated pesticides. *Anal. Chim. Acta* 206, 333–337.

[63] Bello, J. M., Stokes, D. L., and Vo-Dinh, T. (1989) Silver-coated alumina as a new medium for surface-enhanced Raman-scattering analysis. *Appl. Spectrosc.* 43, 1325–1330.

[64] Bello, J. M., Stokes, D. L., and Vo-Dinh, T. (1989) Titanium-dioxide based substrate for optical monitors in surface-enhanced Raman-scattering analysis. *Anal. Chem.* 61, 1779–1783.

[65] Alak, A. M. and Vo-Dinh, T. (1987) Surface-enhanced Raman-spectrometry of organophosphorus chemical-agents.

Anal. Chem. 59, 2149–2153.

[66] Li, Y. S., Vo-Dinh, T., Stokes, D. L., and Yu, W. (1992) Surface-enhanced Raman analysis of p-nitroaniline on vacuum evaporation and chemically deposited silver-coated alumina substrates. *Appl. Spectrosc.* 46, 1354–1357.

[67] Li, Y. S. and Wang, Y. (1992) Chemically prepared silver alumina substrate for surface-enhanced Raman-scattering. *Appl. Spectrosc.* 46, 142–146.

[68] Helmenstine, A. M., Li, Y. S., and Vo-Dinh, T. (1993) Surface-enhanced Raman-scattering analysis of etheno adducts of adenine. *Vibrational Spectrosc.* 4, 359–364.

[69] Helmenstine, A., Uziel, M., and Vo-Dinh, T. (1993) Measurement of DNA-adducts using surface-enhanced Raman-spectroscopy. *J. Toxicol. Environ. Health* 40, 195–202.

[70] Vo-Dinh, T. and Stokes, D. L. (1993) Surface-enhanced Raman vapor dosimeter. *Appl. Spectrosc.* 47, 1728–1732.

[71] Alarie, J. P., Stokes, D. L., Sutherland, W. S., Edwards, A. C., and Vo-Dinh, T. (1992) Intensified charge coupled device-based fiberoptic monitor for rapid remote surface-enhanced Raman-scattering sensing. *Appl. Spectrosc.* 46, 1608–1612.72.

[72] Narayanan, V. A., Begun, G. M., Bello, J. M., Stokes, D. L., and Vo-Dinh, T. (1993) Analysis of the plant-growth regulator Alar (Daminozide) and its hydrolysis products using Raman-spectroscopy. *Analysis* 21, 107–112.

[73] Narayanan, V. A., Begun, G. M., Bello, J. M., Stokes, D. L., and Vo-Dinh, T. (1993) Analysis of the plant-growth regulator Alar (Daminozide) and its (1993) Vibrational-spectra of fluvalinate. *J. Raman Spectrosc.* 24, 123–128.

[74] Narayanan, V. A., Stokes, D. L., and Vo-Dinh, T. (1994) Vibrational spectral-analysis of eosin-y and erythrosin-b—intensity studies for quantitative detection of the dyes. J. Raman Spectrosc. 25, 415–422.

[75] Vo-Dinh, T., Houck, K., and Stokes, D. L. (1994) Surface-enhanced Raman gene probes. *Anal. Chem.* 66, 3379–3383.

[76] Vo-Dinh, T., Miller, G. H., Bello, J., Johnson, R., Moody, R. L., Alak, A., and Fletcher, W. R. (1989) Surface-active substrates for Raman and luminescence analysis. *Talanta* 36, 227–234.

[77] Wachter, E. A., Storey, J. M. E., Sharp, S. L., Carron, K. T., and Jiang, Y. (1995) Hybrid substrates for real-time sers-based chemical sensors. *Appl. Spectrosc.* 49, 193–199.

[78] Liao, P. F. (1982) in *Surface Enhanced Raman Scattering* (Chang, R. K. and Furtak, T. E., eds.), Plenum, New York, p. 379–390.

[79] Vo-Dinh, T., Hiromoto, M. Y. K., Begun, G. M., and Moody, R. L. (1984) Surface-enhanced Raman spectrometry for trace organic-analysis. *Anal. Chem.* 56, 1667–1670.

[80] Meier, M., Wokaun, A., and Vo-Dinh, T. (1985) Silver particles on stochastic quartz substrates providing tenfold increase in Raman enhancement. *J. Phys. Chem.* 89, 1843–1846.

[81] Vo-Dinh, T., Meier, M., and Wokaun, A. (1986) Surface-enhanced Raman-spectrometry with silver particles on stochastic-post substrates. *Anal. Chim. Acta* 181, 139–148.

[82] Liao, P. F. and Stern, M. B. (1982) Surface-enhanced Raman-scattering on gold and aluminum particle arrays. *Opt. Lett.* 7, 483–485.

[83] Enlow, P. D., Buncick, M., Warmack, R. J., and Vo-Dinh, T. (1986) Detection of nitro polynuclear aromatic-compounds by surface-enhanced raman-spectrometry. *Anal. Chem.* 58, 1119–1123.

[84] Volkan, M., Stokes, D. L., and Vo-Dinh, T. (1999) A new surface-enhanced Raman scattering substrate based on silver nanoparticles in sol-gel. *J. Raman Spectrosc.* 30, 1057–1065.

[85] Volkan, M., Stokes, D. L., and Vo-Dinh, T. (2000) Surface-enhanced Raman of dopamine and neurotransmitters using sol-gel substrates and polymer-coated fiber-optic probes. *Appl. Spectrosc.* 54, 1842–1848.

[86] Pal, A., Stokes, D. L., Alarie, J. P., and Vo-Dinh, T. (1995) Selective surface- enhanced Raman-spectroscopy using a polymer-coated substrate. *Anal. Chem.* 67, 3154–3159.

[87] Vo-Dinh, T. and Stokes, D. L. (1999) Surface-enhanced Raman detection of chemical vapors with the use of personal dosimeters. *Field Anal. Chem. Technol.* 3, 346–356.

[88] Stokes, D.L., Pal, A., Narayanan, V.A., and Vo-Dinh, T. (1999) Evaluation of a chemical vapor dosimeter using polymer-coated SERS substrates. *Anal. Chim. Acta* 399, 265–274.

[89] Carron, K. T., Lewis, M. L., Dong, J. A., Ding, J. F., Xue, G., and Chen, Y. (1993) Surface-enhanced Raman-scattering

and cyclic voltammetry studies of synergetic effects in the corrosion inhibition of copper by polybenzimidazole and mercaptobenzimidazole at high temperature. *J. Mater. Sci*. 28, 4099– 4103.

[90] Deschaines, T. O. and Carron, K. T. (1997) Stability and surface uniformity of selected thiol-coated SERS surfaces. *Appl. Spectrosc*. 51, 1355–1359.

[91] Crane, L.G., Wang, D.X., Sears, L.M., Heyns, B., and Carron, K. (1995) SERS surfaces modified with a 4-(2-pyridylazo) resorcinol disulfide derivative—detection of copper, lead, and cadmium. *Anal. Chem*. 67, 360–364.

[92] Sulk, R., Chan, C., Guicheteau, J., Gomez, C., Heyns, J. B. B., Corcoran, R., and Carron, K. (1999) Surface-enhanced Raman assays (SERA): measurement of bilirubin and salicylate. *J. Raman Spectrosc*. 30, 853–859.

[93] Sulk, R. A., Corcoran, R. C., and Carron, K. T. (1999) Surface enhanced Raman scattering detection of amphetamine and methamphetamine by modification with 2-mercaptonicotinic acid. *Appl. Spectrosc*. 53, 954–959.

[94] Zou, S. Z. and Weaver, M. J. (1998) Surface-enhanced Raman scattering an uniform transition metal films: toward a versatile adsorbate vibrational strategy for solid-nonvacuum interfaces? *Anal. Chem*. 70, 2387–2395.

[95] Wilke, T., Gao, X. P., Takoudis, C. G., and Weaver, M. J. (1991) Surface-enhanced Raman-spectroscopy as a probe of adsorption at transition metal-highpressure gas interfaces—NO, CO, and oxygen on platinum-coated gold, rhodium-coated gold, and ruthenium-coated gold. *Langmuir* 7, 714–721.

[96] Tarcha, P. J., DeSaja-Gonzalez, J., Rodriguez-Llorente, S., and Aroca, R. (1999) Surface-enhanced fluorescence on SiO_2-coated silver island films. *Appl. Spectrosc*. 53, 43–48.

[97] Lacy, W. B., Olson, L. G., and Harris, J. M. (1999) Quantitative SERS measurements on dielectric-overcoated silver-island films by solution deposition control of surface concentrations. *Anal. Chem*. 71, 2564–2570.

[98] Lacy, W. B., Williams, J. M., Wenzler, L. A., Beebe, T. P., and Harris, J. M. (1996) Characterization of SiO_2-overcoated silver-island films as substrates for surface-enhanced Raman scattering. *Anal. Chem*. 68, 1003–1011.

[99] Fu, X. Y., Mu, T., Wang, J., Zhu, T., and Liu, Z. F. (1998) pH-dependent assembling of gold nanoparticles on p-aminothiophenol modified gold substrate. *Acta Phys.-Chim. Sinica* 14, 968–974.

[100] Zhu, T., Zhang, X., Wang, J., Fu, X. Y., and Liu, Z. F. (1998) Assembling colloidal Au nanoparticles with functionalized self-assembled monolayers. *Thin Solid Films* 329, 595–598.

[101] He, H. X., Zhang, H., Li, Q. G., Zhu, T., Li, S. F. Y., and Liu, Z. F. (2000) Fabrication of designed architectures of Au nanoparticles on solid substrate with printed self-assembled monolayers as templates. *Langmuir* 16, 3846–3851.

[102] Wang, K. and Li, Y. S. (1997) Silver doping of polycarbonate films for surface-enhanced Raman scattering. *Vibrational Spectrosc*. 14, 183–188.

[103] Yang, X. M., Tryk, D. A., Ajito, K., Hashimoto, K., and Fujishima, A. (1996) Surface-enhanced Raman scattering imaging of photopatterned self-assembled monolayers. *Langmuir* 12, 5525–5527.

[104] Zhu, T., Yu, H. Z., Wang, J., Wang, Y. Q., Cai, S. M., and Liu, Z. F. (1997) Two-dimensional surface enhanced Raman mapping of differently prepared gold substrates with an azobenzene self-assembled monolayer. *Chem. Phys. Lett*. 265, 334–340.

[105] Maeda, Y ., Y amamoto, H., and Kitano, H. (1995) Self-assembled monolayers as novel biomembrane mimetics. 1. Characterization of cytochrome-c bound to self-assembled monolayers on silver by surface-enhanced resonance Raman-spectroscopy. *J. Phys. Chem*. 99, 4837–4841.

[106] Vo-Dinh, T., Allain, L. R., and Stokes, D. L. (2002) Cancer gene detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *J. Raman Spectrosc*. 33, 511–516.

[107] Michota, .A., Kudelski, A., and Bukowska, J. (2000) Chemisorption of cysteamine on silver studied by surface-enhanced Raman scattering. *Langmuir* 16, 10,236–10,242.

[108] Michota, A., Kudelski, A., and Bukowska, J. (2001) Influence of electrolytes onthe structure of cysteamine monolayer on silver studied by surface-enhanced Raman scattering. *J. Raman Spectrosc*. 32, 345–350.

[109] Culha, M., Stokes, D., Allain, L. R., and Vo-Dinh, T. (2003) Surface-enhanced Raman scattering substrate based on a self-assembled monolayer for use in genediagnostics. *Anal. Chem*. 75, 6196–6201.

[110] Culha, M., Stokes, D, and Vo-Dinh, T (2003) Surface-enhanced Raman scattering for cancer diagnostics: detection of the BCL2 gene. *Expert Rev. Mol. Diagn*. 3, 669–675.

[111] Vo-Dinh, T., Stokes, D. L., Griffin, G. D., Volkan, M., Kim, U. J., and Simon, M. I. (1999) Surface-enhanced Raman scattering (SERS) method and instrumentation for genomics and biomedical analysis. *J. Raman Spectrosc.* 30, 785–793.

[112] Isola, N. R., Stokes, D. L., and Vo-Dinh, T. (1998) Surface enhanced Raman gene probe for HIV detection. *Anal. Chem.* 70, 1352–1356.

[113] Graham, D., Smith, W. E., Linacre, A. M. T., Munro, C. H., Watson, N. D., and White, P. C. (1997) Selective detection of deoxyribonucleic acid at ultralow concentrations by SERRS. *Anal. Chem.* 69, 4703–4707.

[114] Dou, X., Yamaguchi, Y., Yamamoto, H., Doi, S., and Ozaki, Y. (1998) NIR SERS detection of immune reaction on gold colloid particles without bound/free antigen separation. *J. Raman Spectrosc.* 29, 739–742.

[115] Ni, J., Lipert, R. J., Dawson, G. B., and Porter, M. D. (1999) Immuno assay read-out method using extrinsic Raman labels adsorbed on immunogold colloids. *Anal. Chem.* 71, 4903–4908.

[116] Rohr, T. E., Cotton, T., Fan, N., and Tarcha, P. J. (1989) Immunoassay employing surface-enhanced Raman-spectroscopy. *Anal. Biochem.* 182, 388–398.

[117] Grabbe, E. S. and Buck, R. P. (1989) Surface-enhanced Raman-spectroscopic investigation of human immunoglobulin-G adsorbed on a silver electrode. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 8362–8366.

[118] Hawi, S. R., Rochanakij, S., Adar, F., Campbell, W. B., and Nithipatikom, K.(1998) Detection of membrane-bound enzymes in cells using immunoassay and Raman microspectroscopy. *Anal. Biochem.* 259, 212–217.

[119] Dou, X., Takama, T., Yamaguchi, Y., Yamamoto, H., and Ozaki, Y. (1997) Enzyme immunoassay utilizing surface-enhanced Raman scattering of the enzyme reaction product. *Anal. Chem.* 69, 1492–1495.

[120] Hirsch, L. R., Jackson, J. B., Lee, A., Halas, N. J., and West, J. L. (2003) A whole blood immunoassay using gold nanoshells. *Anal. Chem.* 75, 2377– 2381.

[121] Mulvaney, S. P., Musick, M. D., Keating, C. D., and Natan, M. J. (2003) Glasscoated, analyte-tagged nanoparticles: A new tagging system based on detection with surface-enhanced Raman scattering. *Langmuir* 19, 4784–4790.

[122] Doering, W. E. and Ni, S. M. (2003) Spectroscopic tagsusing dye-embedded nanoparticles and surface-enhanced Raman scattering. *Anal. Chem.* 75, 6171– 6176.

[123] Sequaris, J. M. L. and Koglin, E. (1987) Direct analysis of high-performance thin-layer chromatography spots of nucleic purine derivatives by surface- enhanced raman-scattering spectrometry. *Anal. Chem.* 59, 525–527.

[124] Koglin, E. and Sequaris, J. M. (1986) Interaction of proflavine with DNA studied by colloid surface enhanced resonance Raman-spectroscopy. *J. Mol. Struct.* 141, 405–409.

[125] Koglin, E., Sequaris, J. M., and Valenta, P. (1980) Surface Raman-spectra of nucleicacid components adsorbed at a silver electrode. *J. Mol. Struct.* 60, 421–425.

[126] Koglin, E., Sequaris, J. M., and Valenta, P. (1982) Surface enhanced Raman-spectroscopy of nucleic-acid bases on Ag electrodes. *J. Mol. Struct.* 79, 185–189.

[127] Kim, U. J., Shizuya, H., Deaven, L., Chen, X. N., Korenberg, J. R., and Simon, M. I. (1995) Selection of a sublibrary enriched for a chromosome from total human bacterial artificial chromosome library using DNA from flow-sorted chro- mosomes as hybridization probes. *Nucleic Acids Res.* 23, 1838–1839.

[128] Kim, U. J., Birren, B. W., Slepak, T., Mancino, V., Boysen, C., Kang, H. L., Simon, M. I., and Shizuya, H. (1996) Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics* 34, 213–218.

[129] Kim, U. J., Shizuya, H., Kang, H. L., et al. (1996) A bacterial artificial chromosome–based framework contig map of human chromosome 22q. *PNAS* 93, 6297– 6301.

[130] 130. Boncheva, M., Scheibler, L., Lincoln, P., Vogel, H., and Akerman, B. (1999) Design of oligonucleotide arrays at interfaces. *Langmuir* 15, 4317–4320.

[131] Pohl, D. W., Denk, W., and Lanz, M. (1984) Optical stethoscopy—image recording with resolution lambda/20. *Appl. Phys. Lett.* 44, 651–653.

[132] Betzig, E., Trautman, J. K., Harris, T. D., Weiner, J. S., and Kostelak, R. L. (1991) Breaking the diffraction barrier—optical microscopy on a nanometric scale. *Science* 251, 1468–1470.

[133] Bian, R. X., Dunn, R. C., and Xie, X. S. (1995) Single molecule emission characteristics in near-field microscopy.

Phys. Rev. Lett. 75, 4772–4775.

[134] Gresillon, S., Aigouy, L., Boccara, A. C., et al. (1999) Experimental observation of localized optical excitations in random metal-dielectric films. *Phys. Rev. Lett.* 82, 4520–4523.

[135] Emory, S. R. and Nie, S. (1997) Surface-enhanced Raman spectroscopy on single silver nanoparticles. *Anal. Chem.* 69, 2631–2635.

[136] Xu, H. X., Bjerneld, E. J., Kall, M., and Borjesson, L. (1999) Spectroscopy of single hemoglobin molecules by surface enhanced Raman scattering. *Phys. Rev. Lett.* 83, 4357–4360.

[137] Bjerneld, E.J., Foldes-Papp, Z., Kall, M., and Rigler, R. (2002) Single-molecule surface-enhanced Raman and fluorescence correlation spectroscopy of horse- radish peroxidase. *J. Phys. Chem. B* 106, 1213–1218.

[138] Byassee, T. A., Chan, W. C. W., and Nie, S. (2000) Probing single molecules in single living cells. *Anal. Chem.* 72, 5606–5611.

[139] Kneipp, K., Haka, A. S., Kneipp, H., et al. (2002) Surface-enhanced Raman spectroscopy in single living cells using gold nanoparticles. *Appl. Spectrosc.* 56, 150–154.

[140] Yan, F., Wabuyele, M. B., Griffin, G. D., and Vo-Dinh, T. (2004) Targeted SERS nanoparticles for intracellular sensing. PittCon 2004, Chicago, IL. March 9–12.

第 13 章　细菌病毒φ29 DNA 包装马达及其在基因治疗和纳米技术中的潜在应用

Peixuan Guo

概　　述

构建了可控 30nm 生仿 DNA 包装马达。马达由 6 个合成的腺苷三磷酸（ATP）结合 RNA[包装核糖核酸（pRNA）]的单体所驱动，类似于用六角螺母驱动螺栓。RNA 构象变化和五重（病毒衣壳）/六重（pRNA 六聚体）的错配可以确保马达利用 ATP 作为能源而连续旋转。在 ATP 和镁的存在下，该马达使用 5μm 包装合成的 DNA。一个 ATP 平均移位 DNA 2 个碱基。DNA 填充衣壳后转换成高达 10^9 PFU/ml（噬斑形成单位）的感染性病毒。用光亲和交联、化学修饰干扰、低温原子力显微镜和计算机建模研究了 pRNA 单体，二聚体和六聚体的三维结构。pRNA 的大小和形状可以随意控制和操纵，形成稳定的二聚体和三聚体。低温原子力显微镜发现，单体、二聚体、三聚体分别显示为勾选轮廓、细长的形状和三角形结构。可通过γ-S-ATP 或乙二胺四乙酸（EDTA）的关闭马达和分别增加 ATP 或镁重新开启马达。马达的复合物及其部件有序结构阵列的形成；pRNA 的 3′端延伸后马达功能的保持；核糖核酸二聚体、三聚体、六聚体易于操纵并拥有所希望的形状和尺寸等研究，使这种含有 RNA 的马达成为药物和基因递送及纳米仪器使用最有前途的工具。

关键词： pRNA；噬菌体φ29；核酶；基因治疗；纳米马达；DNA 包装；六聚体；RNA 结构和功能；纳米生物技术

13.1　导　　论

在生命周期中，病毒基因组 DNA 的复制和结构蛋白合成是由两个独立的细胞系统完成的[1~5]。经过这两个子程序完成后，产生的零件、蛋白质和核酸，必须彼此相互作用形成一个完整的病毒粒子，这个过程被称为病毒 DNA 包装[6,8~14]。双链 DNA（dsDNA）的病毒将其冗长的基因组 DNA 高速移位进入预形成壳（衣壳），并包装成近晶状密度[15,17,18]。因为这是一个能量劣势的运动任务，利用腺苷三磷酸（ATP）作能源，完成病毒 DNA 包装马达[19,20,22~32]。感染枯草杆菌的细菌双链 DNA 病毒φ29，具有线性双链 DNA 病毒的几个共同特点，包括使用一对非衣壳蛋白和 ATP，将病毒 DNA 移位到原衣壳，其中在 DNA 包装之前或 DNA 包装过程中被除去的支架蛋白帮助下，用至少一种成

分参加类似于腺苷三磷酸酶（ATP 酶）的功能化方式，完成原衣壳的预制备[18,33~36]。类似于φ29 马达的病毒例子包括：T4 噬菌体[37]、λ 噬菌体[38,39]、T3 和 T7 噬菌体[40~42]、噬菌体 21[43]、P22 噬菌体[44~46]、P1 噬菌体[47]、psiM2 噬菌体[48]、Sfi21 噬菌体[49]、单纯疱疹病毒（HSV）[50~52]、巨细胞病毒（CMV）[53]、腺病毒[54~56]和痘病毒[57,58]等。这些噬菌体的原衣壳包含一个门头颈连接器（连接器或 DNA 转位顶点）。在这个顶点 DNA 的包装是方向性和定向性的[5,18,33~36]。这对非衣壳 DNA 包装蛋白可分为第 1 组蛋白（该蛋白质是较小并负责 DNA 结合）和第 2 组的蛋白质，该蛋白质较大，即依赖 DNA 的 ATP 酶，就像在某些噬菌体中证明的一样，它特异性地与原壳体[3,30,41,59~74]的头颈连接器结合。如先前报道的一样[30]，基于它们在 DNA 包装的作用，非结构的 DNA 包装组件，根据它们在 DNA 包装中的作用可分为两大类型：①原衣壳的结合，包括 λ 噬菌体[14,38]、φ21 噬菌体的 gp2ÄV [43]、T3/T7 噬菌体的 gp19[28,76,77]和 T4 噬菌体的 gp17 [37]；②DNA 的相互作用，包括 T3/T7 噬菌体的 gp18、λ 噬菌体的 gpNu1、φ21 噬菌体的 gp1 及 T4 噬菌体的 gp16 [30]。在φ29 噬菌体中，参与马达功能的非结构构件，包括包装 RNA（pRNA）、gp16 和 gp3。已经证明 pRNA 和 gp16 与原衣壳和 ATP 结合[79,80]，gp3 与 DNA 结合[81,82]。ATP 水解驱动 DNA 易位。多联体 DNA 作为包装的基底（φ29 噬菌体除外），类似于腺病毒，其中蛋白质以共价连接到病毒基因组[81,82]的每个 5'端。

来自于单纯疱疹病毒（HSV）[83]、马疱疹病毒[84]、巨细胞病毒[85]及鸟类感染性喉气管炎病毒[86]的数据表明，这些病毒类似于双链 DNA 噬菌体在大多数但不是全部包装期一样，利用包装通路进行包装。例如，在这些病毒中，病毒 DNA 也包装成含支架蛋白的原壳体[85~88]。此外，先形成多联体 DNA，然后在成熟过程中切割成单体[41,83,85,89]。非结构的 DNA 包装酶包含一个共同的结合 ATP 结构域[88,90]。此外，用冷冻电子显微镜观察时，DNA 的填充衣壳表现出细小间距曲线条纹的指纹样图形，类似于一些噬菌体[88]。痘病毒也使用多联体 DNA 作为包装基底[91~93]。发现牛痘病毒的 DNA 包装酶是一种潜在的 ATP 酶[57]。腺病毒也分享相似的双链 DNA 噬菌体，包括 DNA 包装成原衣壳[12,55,94]。还发现在不同病毒中存在广泛相似性，在病毒学中 DNA 包装是一个有趣的问题，并且，它与许多其他的生化过程如 DNA 移位、大分子相互作用和生物能学相关。

线性双链（dsDNA）病毒处理之后总是分两步进行体外装配：①马达驱动 DNA 的包装，②病毒体成熟[17,34,95~97]。枯草芽孢杆菌的噬菌体φ29 是研究病毒 DNA 包装马达功能特别理想的模型，因为添加的几乎每一个 DNA 分子，都可以有效地在体外包装，其中所有成分都被过量产生和纯化[5,9,30,79,98,99,101,102]。在φ29 中克隆结构基因产生的原衣壳胜任 DNA 包装，除颈部和尾部蛋白外，并使用该系统制备的 DNA 填充衣壳可以转换成感染性病毒[101,102]。

利用 pRNA 的易操纵结构，已开发完全定义的体外φ29 DNA 包装系统[9]。用纯化的原壳体、gp16、pRNA 和 ATP，加入高达 90%的 DNA-gp3，通过重组基因产物构成的马达可以包装成原衣壳。DNA 包装后，当加入纯化蛋白 gp9、gp11 和 gp13 时，体外装配系统可以将 DNA 填充衣壳转换成感染性φ29 病毒体。通过提取互补及通过使用合成核酸和纯化的重组蛋白组分[103,104]，在体外组装了许多感染性病毒粒子[1~4,74,105~114,116~118]。完全定义的体外 DNA 包装系统，也已经开发和构建了 T3 噬菌体[8]、T4 噬菌体[37]、λ 噬菌体[119]和φ29 噬菌体[9]（表 13.1）。

表 13.1　计量化学实验数据和斜率 [a]

φ29 病毒粒子自组装成分	功能	亚基总数/病毒粒子	化学计量的数学量化	<曲线/(°)	实验斜率（正切）	理论斜率（正切）
DNA-gp3	基因组复合物	1	1	45±4	1	1
原壳体	保存 DNA	1	1	47±3	1	1
pRNA 三聚体	DNA 包装	6	2	56±2	1	1.48
pRNA 二聚体	DNA 包装	6	3	64±5	2	2.05
pRNA 单体	DNA 包装	6	6	72±3	3	3.14
gp9	尾纽结蛋白	10	9	77±2	4	4.33
gp11	尾领	12	12	79±1	5	5.67
gp12	反受体	24	12	80±2	6	5.67

a. 转载自参考文献[80]并征得许可

13.2　φ29 DNA 包装马达的组件

13.2.1　原衣壳和 DNA 包装马达

在双链 DNA 病毒的 DNA 包装过程中，原衣壳发挥了积极作用。噬菌体原衣壳很大程度上由三个结构蛋白组成：①衣壳蛋白，②支架蛋白，③连接器蛋白[36,95,120]。由低温电子显微镜图像重构[121]获得了φ29 的空原衣壳前体的三维（3D）结构。φ29 的二十面体原衣壳由 235 个拷贝主要衣壳蛋白（gp8）、26 个拷贝支架蛋白（gp7）、12 个拷贝头尾链接蛋白（gp10）组成[260]。研究这三种蛋白质序列的相互作用发现[122]，φ29 原壳体装配有很大不同的单组件通路，并且支架蛋白、主要衣壳蛋白并存，同时连接器必须高于阈值浓度以形成φ29 原衣壳。在这样的过程中，支架蛋白连接主要衣壳蛋白和连接器蛋白。已观察到这三个组件的相互作用快到还没有明确的中间体就已经完成。

13.2.2　衣壳蛋白

衣壳蛋白是形成病毒蛋白质外壳的主要结构元件。实例包括λ噬菌体的 gpE[123,124]、基因 23（主要衣壳亚基）或基因 24（五聚体亚单位）的 T4 噬菌体产物[37]及φ29 噬菌体的 gp8[122]。除了起结构作用外，已发现衣壳蛋白可以起包装作用。例如，在噬菌体λ的衣壳蛋白中的错义突变可以抑制仍然是正常形态的噬菌体原头的包装[126~128]。有报道认为原衣壳可能参与双链 DNA 病毒φ6 [129]的 ATP 结合过程。

13.2.3　支架蛋白

支架蛋白是原衣壳成功组装必需的结构蛋白，但不是成熟病毒粒子的一部分；在

DNA 包装开始或 DNA 包装过程中，它们从原衣壳中释放出去。φ29 噬菌体支架蛋白（gp7）不需要 DNA 包装中原衣壳的管理[4,36]。一旦它们首次被释放，噬菌体 P22 的支架蛋白就催化和用于第二原衣壳组装[109]。但是，目前尚不清楚支架蛋白的确切功能，有可能承担了多个角色。例如，支架蛋白可形成围绕其衣壳蛋白组装的核心结构[130~135]。在某些情况下，它们可以作为分子伴侣促进衣壳蛋白的正确折叠。此外，除原衣壳内的细胞蛋白外，它们还间接参与假定衣壳蛋白/连接器蛋白的相互作用，或促进 DNA 初期进入原壳体[97]。

13.2.4　连接器

马达基本组分之一是连接器复合物，即十二连体结构与中央通道（30～60Å），通过包装病毒 DNA 进入到衣壳和感染时退出[50,136~141]。φ29 连接器是一个梯形圆柱体，通过 3.6nm 中央通道，DNA 进入衣壳。虽然个别不同病毒门户蛋白共享很少的序列同源性，并表现很大变化的分子质量，但门户复合物具有大量形态学相似性[35]。在噬菌体φ29 中，以原子分辨率测定了噬菌体门户蛋白的结构[136,137]。连接器环由 12 个α-螺旋亚基组成，由每个亚基的 3 个长螺旋形成中央通道。连接器的宽端为 138Å，窄端为 66Å。内部通道顶部是 60Å 和底部为 36Å。连接器的宽端位于噬菌体原头，窄端部分伸出衣壳。连接器位于病毒衣壳五重对称连接器，导致衣壳和门户[35,142]之间的对称性错配。已经指出，在 DNA 的包装中，门户蛋白的平稳旋转需要这样的错配[142,143]。

13.2.5　基因组 DNA

病毒编码蛋白与φ29 基因组的每个 5′端共价连接[144~146]。终端蛋白 gp3 既作为引物进行 DNA 复制[147]的启动，也作为用于 DNA 包装的基本蛋白质[5,99]。通常情况下，用 4 8 抑制物敏感突变体（琥珀突变或无义突变）从感染细胞[98]中纯化φ29 DNA-gp3。在该突变体中，当噬菌体在不允许宿主中生长时，不会产生新的蛋白质，这时可分离大量的噬菌体 DNA-gp3。从克隆的基因产物中也纯化了 gp3[82]。感染性 DNA-gp3 可以在体外合成[82,103,145~149]。

13.2.6　gp16

各种噬菌体的两个非衣壳 DNA 包装蛋白，显然配合衣壳连接到 DNA 包装基底，从多联体切割成 DNA 单体，并作为一种 DNA 易位酶和（或）ATP 酶。人们发现，φ29 的 gp16 包含一致的 A 型和 B 型 ATP 结合序列，预测了 ATP 结合的二级结构[30]。gp16 的 A 型序列是“碱性—疏水性区域-G-X_2-G-X-G-K-S-X_7—疏水性”。所有双链 DNA 噬菌体非结构性 DNA 包装蛋白之一，都可能担当 ATP 酶的功能[30]。该预测得到后来研究的支持，包括 T4 噬菌体[150]、λ 噬菌体[38,152,153]、T3 噬菌体[154]、P22 噬菌体 [155]，以及疱疹病毒[88,90]和痘苗病毒[57]。

gp16 是相当疏水的，在大肠杆菌中过量产生时，它凝聚成块状而失去生物活性。已

经开发了一个非常简单的方法，单个纯化步骤可将 gp16 纯化至均质可溶且有活性[9]。凝集块（包涵体）通过差速离心收集，用盐酸胍蛋白变性和溶解，在 7.5mol/L 尿素存在下过交联葡聚糖柱。洗脱 gp16，分离峰纯度大于 90%。然后，将纯化的 gp16 通过对氯化钾透析复活[9]。已经证明，gp16 的两个独特的半胱氨酸残基对于生物活性是重要的，因此，盐酸胍用于变性时严格需要还原剂二硫苏糖醇。

已经发现 gp16 结合 ATP [19,30,156,157]，但 gp16 在φ29 DNA 包装马达中的作用仍然是一个谜。φ29 gp16 的疏水性、低相容性和自聚集特性，长期制约人们对包装机制的深入了解。关于 ATP 酶活性矛盾数据，结合位点和 gp16 的计量化学已有报道[19,30]。在传统的方法中[30]，gp16 在变性条件下纯化，通过对 4mmol/L 氯化钾缓冲液透析复性 40min 获得活性 gp16，但复性后的 gp16，15min 内会再凝集。最近有报道称，通过 *groE* 共表达可使 gp16 在细胞中溶解[157]。事实上，通过使用这种共表达系统可纯化活性 gp16。然而，尽管用 *groE* 基因共表达解决了在细胞内聚集问题，但还没有解决纯化后的自聚集问题。用聚乙二醇和丙酮可以帮助解决 gp16 纯化中的均质和高活性问题[19,259]。

13.2.7 包装 RNA（pRNA）

即使考虑与其他双链 DNA 病毒有关 DNA 的相似之处，但φ29 的特异性结构的几个方面还是有新的、独特的特点，因此，它是进一步研究的特别有前途的选择。120nt RNA（1987 年发现[98]）对马达的正常运转至关重要。这种 pRNA 结合 ATP[80]和增强 gp16[156]的 ATP 酶活性。已报道了 pRNA/连接器复合物的计算机模型[158]。值得注意的是，pRNA 结合连接器并积极参与 DNA 转运[79,159]，但 DNA 的包装完成后留下了衣壳[160]；成熟病毒粒子中不存在φ29 编码 pRNA[98]。通过其他噬菌体系统发生分析显示，pRNA 类似但截然不同；很少有保守碱基，不过观察到的二级结构非常相似[161,162]。在其 DNA 包装中来自其他噬菌体 pRNA，不能取代φ29 pRNA[161]。

13.2.7.1 pRNA 的两个结构域

pRNA 的两个功能域是原衣壳结合结构域，位于中心区域[159,163～165]，碱基 23～97 和 DNA 易位结构域，位于 5′/3′配对末端[166]。已有许多不同的方法确认这个结果，包括碱基缺失和突变[166～169]、核糖核酸酶探测[160,161,163]、寡聚靶定[170]、噬菌体组装抑制的竞争测定法[171～173]、门户蛋白紫外线交联[159]、补骨脂素交联[160]和计算机建模等[158]。据报道，pRNA 与原衣壳结合时，暴露在溶剂 pRNA 的 $C^{18}C^{19}A^{20}$ 隆起[174]，是 DNA 易位的关键[143,162,163,169]。$C^{18}C^{19}A^{20}$ 隆起可能直接涉及 ATP、gp16、DNA-gp3 或衣壳组分的相互作用。

13.2.7.2 二聚体、三聚体和六聚体的形成

pRNA 二聚体是构件，通过二聚体→四聚体→六聚体的途径完成六聚体自组装。六个φ29 pRNA 个体通过右环（碱基 45～48）和左环（碱基 82～85）之间的分子间碱基配对形成环[143]。用冷冻原子力显微镜（cryo-AFM）直接观察 pRNA 单体、天然的和共价连接的二聚体及天然三聚体的三级结构。pRNA 单体折叠成一个勾选形结构，该二聚体

具有细长形状，三聚体显示出三角形形状。Mg^{2+}可诱导 pRNA 的二聚体适当折叠[160,174]。pRNA 二聚体结合到门户顶点（连接器）和作为六聚体组件的构建材料[164,174]。DNA-易位机器是由六聚复合物形成齿轮；这表明，所采用的机制与汽车发动机的六个气缸的连续烧制相似。碱基配对是通过具有突变环序列 pRNA 构建实验过程所证明。在文字中用大写和小写字母来分别表示 pRNA 的右手环和左手环。互补序列由相同大写和小写字母划定。例如，在 pRNA A-a′，右环 A（5′$GGAC_{48}$）和左环 a′（3′$CCUG_{82}$）是互补的，而在 pRNA A-b′，右环 A 的四个碱基都没有对左环 b′（3′$UGCG_{82}$）的序列互补。突变 pRNA 互补环序列（如 pRNA I/i′）是在φ29 DNA 的包装中活化，而非互补环突变体（如 pRNA A/b′）是没有活性的[175,176]。人们发现，pRNA A-i′和 I-a′只有在 DNA 包装中无活性，但是当 A-i′和 I-a′混合在一起时，DNA 的包装活性又得到恢复。这个结果是通过 pRNA 环的运输互补性解释；pRNA A-i′与 pRNA I-a′的左环 a′配对[175,176]。

13.2.7.3 pRNA 的化学计量测定

如同 pRNA 在 DNA 包装中的作用确定是第一步一样，在每个 DNA 包装情形中正确确定有多少 pRNA 拷贝是很重要的。许多方法已证明，判定 pRNA 的化学计量和马达功能的必要成分是有益的[163,172,175,177,178]。这些不同的方法已经表明，在φ29 DNA 的易位马达中存在六个 pRNA。这样的方法包括二项式分布[172,178]、浓度依赖性比较斜率[103,172]；并通过使用几套两连锁 pRNA、三连锁 pRNA 和六连锁 pRNA 找出 2、3 和 6 的公倍数[175]。

1．二项分布[172,178]

在 5′/3′配对区 pRNA 突变保留原衣壳结合能力，但失去 DNA 的包装功能。当突变体 pRNA 和野生型（WT）（图 13.1）pRNA 以各种比率体外装配分析中混合时（如 30%的突变体和 70%的野生型），原衣壳具有一定量的突变体概率和通过扩大二项式确定一定量的野生型 pRNA 如下：

$$(p+q)^Z=\binom{Z}{0}p^Z+\binom{Z}{1}P^{Z-1}q+\binom{Z}{2}p^{Z-2}q^2+\ldots\binom{Z}{Z-1}pq^{Z-1}+\binom{Z}{Z}q^Z=\sum_{M=0}^{Z}\binom{Z}{M}p^{Z-M}q^M$$

式中，$\binom{Z}{M}=\left[Z!/M!/(Z-M)!\right]$；在反应混合物中，$Z$ 是每个衣壳 pRNA 的总数，p 和 q 分别是突变型和野生型 pRNA 的百分比。例如，如果每个原衣壳 DNA 包装（Z）需要 pRNA 的总数为 3，则突变体（M）和在给定的原衣壳的野生型（N）pRNA 的所有组合的概率可以通过扩张二项式来确定：$(p+q)^3=p^3+3p^2q+3pq^2+q^3=100\%$。也就是说，在原衣壳群中，能够确定作原衣壳的概率，分别拥有三个拷贝突变体 pRNA，两个拷贝突变体和一个野生型拷贝，一个拷贝突变体和两个拷贝野生型或三个拷贝野生型分别由 p^3、$3p^2q$、$3pq^2$ 和 q^3 代表。假设反应混合物中有 70%的突变体和 30%的野生型 pRNA，那么具有一个拷贝突变体两个拷贝野生型的原衣壳的百分比将是 $3pq^2$，即 $3(0.7)(0.3)^2=19\%$。如果每个原衣壳只有一个突变 pRNA 而足以使原壳体无法包装 DNA，那么只有那些具有三个结合野生型 pRNA（零突变 pRNA，q^3）的原衣壳才能包装 DNA。来自经验数据病毒粒子的产率作图并与一系列预测曲线相比，可以找到最佳拟合。人们发现，与实验抑

制曲线最密切相似，包括斜率和幅度、预测的曲线，其中 Z=5 或 6 [172]。

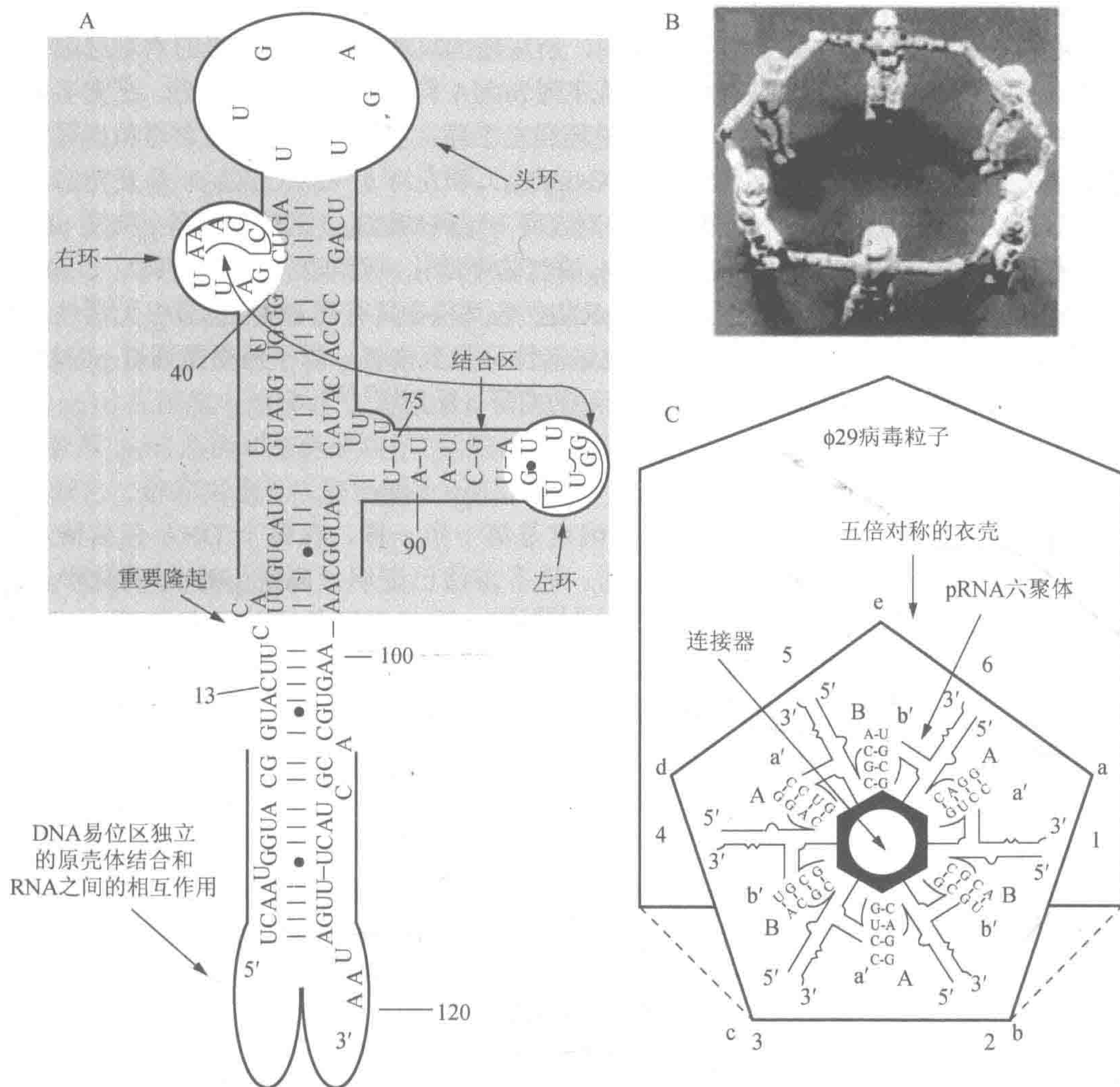


图 13.1　φ29 病毒颗粒上 pRNA 的结构、结构域和位置。（A）pRNA（A-b'）的二级结构。A 和 b'是左和右环负责分子间的相互作用。分子间结合结构域（阴影区）和反应性的 DNA 易位结构域用粗线标记。4 种碱基中的右和左的环，负责分子间的相互作用，位于盒中。（B）“金刚战士”手牵手相互作用描绘 pRNA 六聚体。（C）φ29 粒子显示经由 pRNA（A-b'）和（B-a'）的相互作用形成 pRNA 六聚体的 DNA 包装马达。五角星为五倍对称衣壳顶点，末端为病毒体侧视图。pRNA 的中心区域结合到连接器和 5'/3'配对区向外延伸（转载自参考文献[162]并获得许可）

2．浓度依赖性的斜率[103,172,179]

体外φ29 装配对各种组件的浓度-剂量响应曲线，已用于近似 pRNA 的化学计量。用已知化学计量的φ29 装配组件作为标准对照。在这些曲线中，组件的化学计量越大，反应中稀释因子的影响就越大。如同φ29 装配中基因组 DNA 的情况一样，实验斜率表明一个拷贝组分参与一个病毒的组装。斜率大于 1 提示，多拷贝参与了组装。使用这种方法，

对 DNA-gp3、gp11、gp12 和 gp16 的化学计量进行了比较。其结果与 gp11 和 gp12 的化学计量大于 gp16 和 pRNA 的化学计量的其他方法相符。已知 gp11 和 gp12 在φ29 组件的化学计量是 12，而 pRNA 的化学计量是 5 和 6 之间。有趣的是，曲线 gp16 和 pRNA 不重叠。这样的差异是否可能由于 pRNA 或 gp16 的重新利用尚待阐明。

3．3 和 6 公倍数

这种化学计量方法，开始于分子间混合两种无活性突变的具有互补环的 pRNA，然后测定这些混合物中 DNA 包装的活性[175,176]。在 pRNA 的预测二级结构中出现了两个环，称为左、右手环[162]。这两个环（右手环碱基 45～48，左手环碱基 82～85）的序列是互补的，最初提出形成一个假结[165]。然而，许多研究表明，这两个序列分子间相互作用，形成 pRNA 多聚体的。用突变左手环和右手环序列构建了几个 pRNA。

（1）两连锁 pRNA 的集合[175]

在 pRNA 研究中一个重要的发现是，混合两种突变 pRNA 与易位互补环恢复完整 DNA 包装活性。单独 pRNA A/b′和 B/a′在包装时无活性，但是，当它们混合在一起时，DNA 的包装活性被恢复；对 pRNA A/b′的右手环 a′与 pRNA B/a′的左手环配对。由于混合两种无活性的有连锁环 pRNA，如当 pRNA I-j′和 J-i′以 1∶1 摩尔比混合时，感染性病毒粒子生产的结果，pRNA 的化学计量被预测为 2 的倍数。将二项式分布和连续稀释分析的结果综合考虑，强烈表明 pRNA 的化学计量是 6。

（2）三连锁 pRNA 的集合[175]

类似的步骤，用来确认通过手拉手相互作用形成三聚体。另一套突变体，由三个 pRNA A-b′、B-c′和 C-a′组成。这套几何学预计形成 3、6、9 或 12 聚合体环，它们承载三个突变体的每个突变体。当单独测试时，每一个单独 pRNA 表现出很少或没有活性。当任何三种突变体的两个混合时，还是很少或检测不到活性。然而，当所有的三个 pRNA 以 1∶1∶1 混合时，DNA 包装的活性完全恢复。预计混合物中只有两个突变体 pRNA 缺乏活性和三种突变 pRNA 混合物还原活性，因为每一个 RNA 的突变被设计成是有三个 RNA 都存在才能产生闭合的环。当混合在一起三个无活性的 pRNA 全部有活性，这表明 pRNA 在 DNA 包装复合物中的数量是 3 的倍数，除了是 2 的倍数外。因此，DNA 包装需要 pRNA 的数目必须是公共倍数 2 和 3，有可能是 6（或 12，但这个数已经被二项分布和连续稀释的分析最终排除[172]，它揭示 pRNA 的化学计量为 5 和 6 之间，确认该化学计量 pRNA 是 6）。

（3）六连锁 pRNA 的集合[175]

DNA 包装的活性也可以通过混合六个突变 pRNA 来获得，其中每一个单独使用时均无活性。因此，预测连锁六聚环由连锁环的碱基配对形成的。

（4）其他φ29 组分的化学计量

高度敏感的体外φ29 组装系统，已用于确定组装所需要的每个组件的化学计量[103,104,172,173,178]。对数/对数图的方法包含只有功能性单元（寡聚或复合体）无亚基拷贝数。原衣壳尽管含有支架蛋白 gp7、235 拷贝[26]、衣壳蛋白 gp8、12 拷贝和门户蛋白 gp10 拷贝，但还是被视为一个组件一样的复合物。由于 DNA 和末端蛋白 gp3 共价连接，DNA-gp3 也被视为一个组分。对数/对数图显示，对于衣壳对数/对数浓度依赖性曲线的

斜率是 1；因此，一个病毒的组装需要原衣壳的一个拷贝[103,104,172,173,178]。DNA-gp3 基因组以相同的方式起作用。用对数/对数斜率分析[178]、二项分布[172,178]、2 和 3 的公倍数[175,180]、在胶体中的迁移率[181]和电子显微镜（EM）[182,183]已确定 pRNA、gp11、gp12 化学计量分别为 6、12 和 12。虽然已经发现六个 pRNA 形成六聚体作为 DNA 易位马达的重要部分，但在体外则由个别 pRNA 分子或络合物装配六聚体。如果六聚体是由一节 A-a′或 B-b′单聚体，或六个单聚体 A-b′、B-c′、C-d′、D-e′、E-f′、F-a′组装的[175]，该单体被视为一个组分，pRNA 单体的化学计量是 6 [162]。如果该六聚体是由(I-a′)/(A-i′)构成的纯化二聚体组装时，该二聚体被看作一个部件，和二聚体的 RNA 化学计量为 3[164,175]。如果该六聚体是由纯化的(A-b′)/(B-c′)/(C-a′)三聚体，三聚体被认为是一种组分和三聚体-RNA 的化学计量是 2[162,175]。人们发现，包装成φ29 装配中间体[184,185]之前，gp12 形成二聚体，那么每个二聚体 gp12 都被视为一个组件。因此，gp12 的化学计量是 12，代替 24，在每个φ29 病毒粒子中有 24 个拷贝的 gp12 的事实被忽略。在大肠杆菌中表达后，纯化的尾部蛋白 gp9 已经证明，组装的φ29 在体外有活性。已报道在病毒粒子中的 gp9 绝对拷贝数为 9[181]。

13.2.8　ATP：马达能量的来源

DNA 进入原衣壳的易位能量劣势非常明显。衣壳内的 DNA 排列非常紧凑，而且包装[15,186]之前，将包装的 DNA 经历与其包装前体积相比减少了 DNA 体积的 30～100 倍。由 ATP 水解驱动的不利反应结论，是从包括噬菌体 λ [2,152,153,187～189]、P22 [155]、φ29 [5,9,30]、T3/T7 [8,10,28,29,62,63,154,190]、T4 [37,150]和 P2 [69,70]的研究中推断出来的。DNA 包装中 ATP 消耗首次定量，是在有纯化组件的φ29 系统中完成的[30]。在体外 DNA 包装系统的定义中，ATP 水解成腺苷 5′-二磷酸和 Pi。包装φ29 DNA 中 2bp 大约需要一个 ATP。同样，发现噬菌体 T3，包装 T3 DNA 的 1.8bp 需要一个 ATP 分子[28]。然而，在 T3 中发现[28]两个分离的 ATP 酶存在活性。其中之一称为需要病毒 DNA 的酶切 ATP 酶（pac-ATPase），而另一个称为非酶切 ATP 酶（non-pac-ATPase），该酶受非包装（即单链或环状的）DNA 或（非特异性）RNA 激发。然而，初始活化后，缺乏病毒 DNA 的情况下，非酶切 ATP 酶仍保持活性。这些个别 ATP 酶活性可以通过与其他成分混合来激发。例如，原头的 ATP 酶活性通过添加φ29 DNA 进行刺激，并发现，完成包装反应，需要 ATP 酶活性增加 5 倍[30]。最近的研究结果表明，pRNA 对 gp16 的 ATP 酶活性有作用，刺激它增加了 4 倍。这种 ATP 酶活性只有在 pRNA 存在时才能持续，表明 gp16-pRNA 复合物的形成。同样，与单独原衣壳刺激[156]缺乏活性相比较，有 pRNA 原衣壳刺激 gp16，ATP 酶活性增加了 10 倍。来自φ29 和 T3 系统的结果提示，DNA 的包装系统中 ATP 的消耗是非常复杂的。ATP 可能用于 DNA 包装和易位的启动。在φ29 中包装系统的所有部件，包括 pRNA、原壳体、gp16 和 DNA-gp3 都涉及 ATP 酶最大活性的产生。

13.3　病毒 DNA 填充马达的运动机制

13.3.1　试图阐明φ29 马达机制的实验

13.3.1.1　体外包装系统高灵敏度方法的建立

利用 pRNA 容易操纵的结构，开发了体外φ29 DNA 包装系统[9]。用纯化的原衣壳体、gp16、pRNA 和 ATP，加入高达 90%的 DNA-gp3 的经由重组基因产物构成的马达可包装成原衣壳。DNA 包装后，加入纯化的蛋白质 gp9、gp11、gp12 和 gp13，体外装配系统可以将 DNA 填充衣壳转换成感染性φ29 病毒粒子[103,104]。有了这个系统，在所有需要的组件存在的情况下，可获得高达 5×10^9 感染性病毒粒子/ml，但是即使缺乏一个必要成分就检测不出一个传染性病毒粒子。具有 8 个数量级的敏感性的这种系统，已应用于 DNA 包装马达[180,192]功能的分析。

13.3.1.2　环形排列 pRNA

分析 pRNA 功能的一个重要方法，已经构建了环形排列 pRNA（cp-pRNA），其中，pRNA 的任何内部碱基可以被重新分配给 5′或 3′新末端[169,193]。将由 3 或 17 碱基环序列分离的两个串联 pRNA 编码序列，克隆到质粒中。设计聚合酶链反应（PCR）的引物对，如 P6/P5，与串联 pRNA 编码序列内不同位置互补，将 cp-pRNA 的转录合成 PCR 片段。结果表明，无论是小环还是大环都不会干扰该分子的生物活性。已证明非起始碱基或邻近于它们的碱基，可以作用于构建活性 cp-pRNA 的新末端；该系统大大方便了通过 PCR 构建突变体 pRNA，并用放射同位素、荧光[194]或光亲和剂标记任何特异性的内部碱基。

13.3.1.3　计算机建模

对 pRNA 结构建模的目的是组织收集交联、化学或核糖核酸酶探针、化学修饰干扰、低温原子力显微镜的结构数据，以及其他遗传数据转换成三维形式。因为大量的结构参数是可用的，所以计算机程序可以成功构建三维结构[158,195,196]（图 13.2）。

X 射线晶体学研究已经表明，φ29 连接器包含三个部分：一个窄端、一个中央部分和一个宽端，直径分别为 6.6nm、9.4nm 和 13.8nm[136,137,197]。Hoeprich 和 Guo[158]介绍了六聚 pRNA 模型为直径 7.6nm 的中心通道，该通道也许可以鞘到连接器的窄端，由连接器的中心部分锚定，该部分比 pRNA 六聚体中心通道更宽。

连接器结合结构域位于 pRNA 初级序列的中间（即碱基 23～97 位），DNA 的易位结构域位于 5′/3′配对末端。据预测，连接器蛋白（gp10）含有保守的 RNA 识别基序（RRM），位于每个 gp10 单体残基 148～214。gp10 区域位于十二聚体连接器从衣壳突出的窄端[156,198]。Hoeprich 和 Guo [158]的六聚体模型与上述数据相一致，显示连接器结合域内 pRNA 碱基 23～97 与预测的连接器 RRM 基序和 5′/3′配对区，包括 DNA-易位结构域、延伸远离连接器等相互作用。

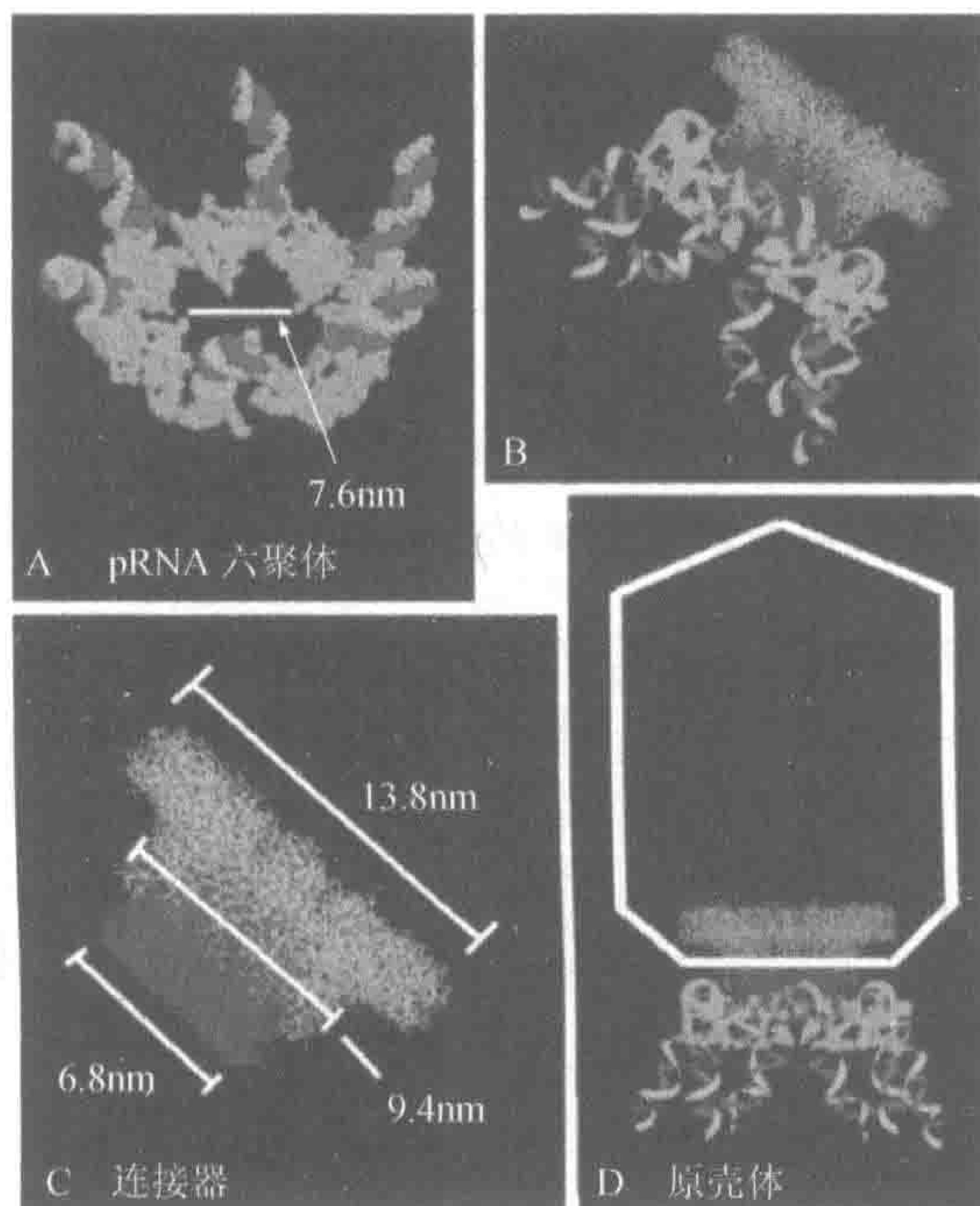


图 13.2　细菌病毒φ29 pRNA 六聚体和马达复合物计算机模型。(A) 六聚体显示绿色的连接器结合结构域，以及红色的 DNA 的易位结构域 (5′端) 和蓝色 (3′端)。5′/3′配对区的 DNA 易位域指向上方。(B) 结晶的连接器的结构 (转载自参考文献 Valle, Kremer et al., 1999; Valpuesta, Fernandez et al., 1999)。在 RNA 识别基序是蓝色的。(C) pRNA 六聚体对连接器的 RNA 结合结构域的对接。(D) 原衣壳底视图 (转载自 Shu, Huang et al., 2003，*J. Biol. Chemistry* 并征得许可) (彩图请扫封底二维码)

13.3.1.4　使用光学镊技术测定马达力

光学镊技术提供了一个衡量包装力和速度的有趣方法[199]。在此过程中，部分包装马达复合物，经由非包装的 DNA 使微球附着于它。该微球束缚于光阱中并拴住第二珠子。当 ATP 介入和启动包装，两个珠子移动靠拢在一起。监测 DNA 张力的量，并从该珠子的位移来计算；包装动力学的各种测定，然后可能检查包括包装“滑动”和“暂停”的存在，即在包装速度中哪儿出现了谬误。用额外的负载，防止 DNA 被插入需要的力约为 57pN，研究证明，到目前为止，φ29 DNA 包装马达是最强生物马达。使用该方法，已经能够测定φ29 DNA 包装的速度，它最初是约 100bp/s 的速度，逐渐减缓至衣壳填充时停止[199]。原衣壳和 pRNA 之间的五重/六重对称性错配，已引用帮助解释马达旋转[142,143,180]的机制，而包装过程中 DNA 移动到衣壳的具体机制还尚未阐明。

13.3.2　φ29 DNA 包装模型

人们普遍认为，pRNA 是 ATP 酶的一部分，并具有至少两种构象：舒张型和收缩型。由 ATP 水解驱动，导致舒张和收缩状态之间的交替出现，六聚体 pRNA 复合物个别部分

帮助旋转机械移位。结合 ATP 的蛋白质 gp16 也参与 ATP 水解。

DNA 的包装过程中，个别 pRNA 分子间环/环相互作用的要求，已经产生了 pRNA 形成六聚体的信念[175,176]，并支持结合 pRNA 的连续动作的模型。DNA 包装时个别 pRNA 可能需要互相通信，以确保运动是连续的。跨膜 pRNA 经过环的相互作用可能为相邻 pRNA 传递信号，调节顺序的构象变化和（或）相互作用。因此，右手环和左手环之间的碱基配对，可能需要将构象变化从一个 pRNA 转移到相邻的一个 pRNA。

DNA 易位进入φ29 原衣壳已提出几种模型[137,143,200~202]。人们普遍认为，DNA 通过门户顶点的轴向孔易位，很像一个螺纹杆沿着螺母移动。另一个模型假设，超螺旋的 DNA 缠绕在门户顶点，它允许 DNA 旋转，经由顶点外侧进入原衣壳[202]。在 1997 年提出的一个模型中[143]，与其他成分结合，多重 pRNA 的连续动作是对 DNA 包装起至关重要的作用。6 个拷贝 pRNA 形成六聚体，与衣壳五聚体相互作用并移动离散 12° 的步幅（图 13.3）。马达每完成一圈旋转需要 30 个 ATP。这种模型是最近用结晶学、互补修饰、光亲和交联、化学修饰、化学修饰干扰、核酸探针、原子力显微镜及计算机建模[158]的方法得到的现有的吻合良好的三维结构数据[137]。

参考文献[137]中提出的这个模型中，位于中央通道的 DNA 与门户的一个亚基相互作用。连接器窄端 12° 旋转经由长螺旋角的微小变化导致连接器的纵向扩张，连接器的宽端跟随着连接器窄端。当 DNA 2bp 移位进入衣壳时，这样的“跟随”允许结构舒张和收缩[137]。此外，最近提出并评估了 DNA 包装的“马达棘轮”模型[17]。在这个模型中，连接器经由热、偏置热或振荡过程进行整流 DNA 的运动。马达棘轮假说已广泛用于数据解释，涉及生物化学、遗传学、热力学、结构和包装中的动力学。连接器和 pRNA [158] 两个结构表现定位倾斜朝向一个方向。

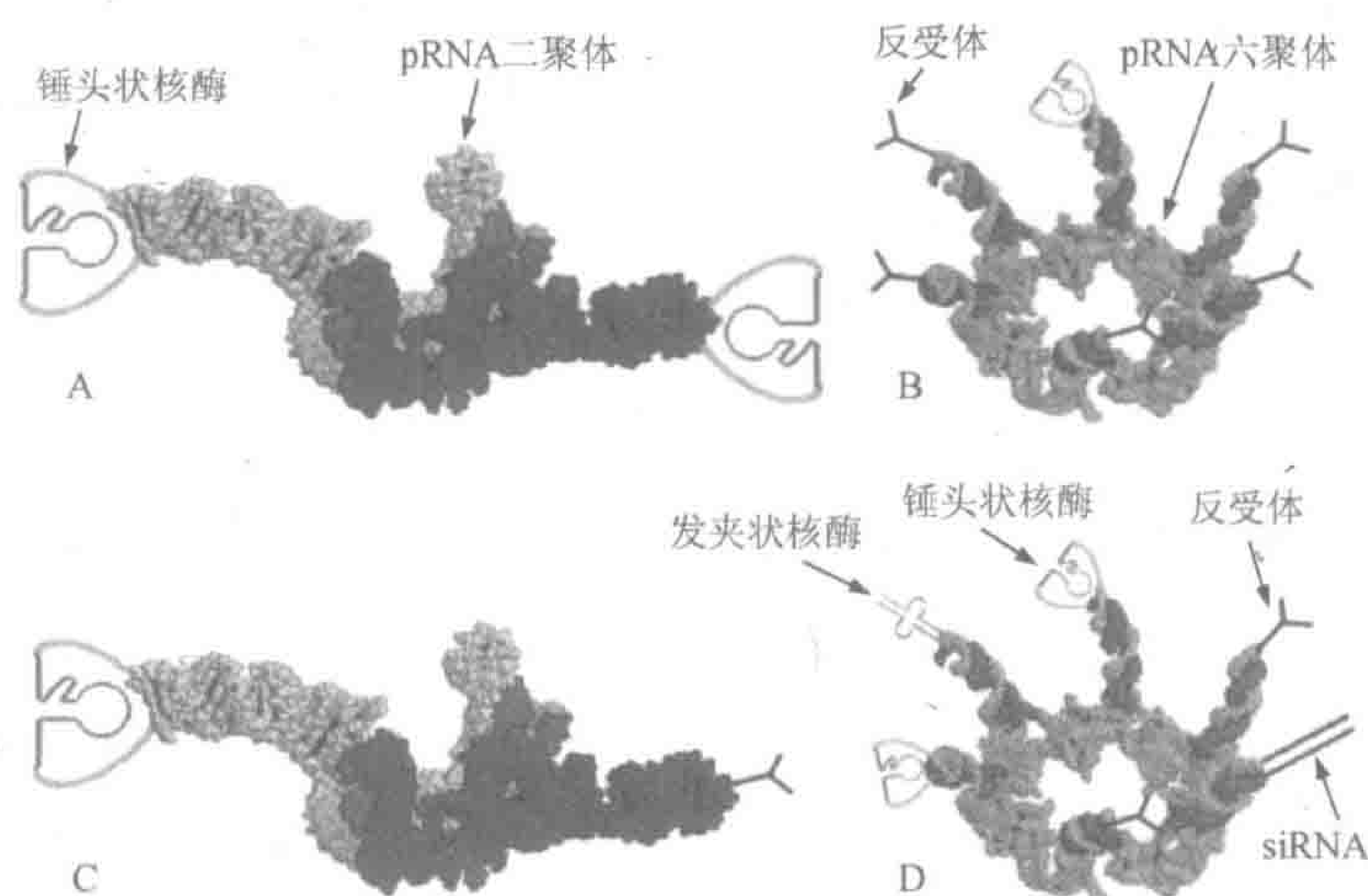


图 13.3 φ29 pRNA 作为多价车辆用于治疗的递送基因。pRNA 多聚可用于靶向细胞受体和共同递送治疗的 siRNA，核酶或其他生物活性分子（改编自 Shu, Huang et al., 2003，*J. Biol. Chemistry*）（彩图请扫封底二维码）

图 13.4　嵌合 pRNA 港湾核酶简图。(A) pRNA 的序列与二级结构。弯曲曲线指向两个环相互作用。(B) pRNA 结构轮廓/核酶嵌合体。在 B 型肝炎病毒基因 mRNA 靶向核酶与 pRNA 5′端和 3′端连接（改编自 Hoeprich, Zhou et al., 2003，并征得 Nature Publisher 的许可）

下面讨论，至少提出了 4 个不同的模型来描述来自这种马达产生的 DNA 易位特异性机制。

13.3.2.1　模型 1

DNA 运动的力是布朗运动[17,203,204]。马达是棘轮[17]，仅仅用于确保 DNA 在一个方向上运动，但反之则不行。

13.3.2.2　模型 2

DNA 通过门户顶点的轴孔易位，很像一个螺纹杆穿过螺母，因此 DNA 的包装是利用双链 DNA[142]的“螺纹”螺旋性质实现的。由 pRNA 和连接器组成的马达，就像一个六角螺母驱动螺栓一样运作[143]。这个模型建立的依据包括 DNA 以固定距离旋转有规律地易位移动到马达匝数。

13.3.2.3 模型 3

马达零部件的五重/六重对称错配和连续的收缩和舒张，产生马达旋转所需的力[142,143]。如果这种模型是正确的，就会发现在组件以 12°间隔分离步骤旋转。

13.3.2.4 模型 4

位于中央通道的 DNA 与门户[137]中的一个亚基相互作用。连接器的窄端 12°旋转经由长螺旋角的微小变化，导致连接器纵向扩展；从连接器的宽端紧接窄端。这样的“跟随”允许结构舒张和收缩，同时将 2bp DNA 转移进入衣壳结构[137]。该模型提示，连接器完成一个旋转需要传送 60bp DNA 进入原衣壳。

13.4 φ29 纳米马达在研究和纳米技术中的应用

13.4.1 具有组成纳米设备潜力的纳米马达

驾驭和应用纳米马达的能力，在纳米技术领域具有广泛前景和革命化的潜力[205~207]。一个可行的选择是继续开发纳米技术的机械部件，将φ29 马达和其他马达及它们的组成部分合并成纳米设备。涉及的技术通常为表征、操纵、改性、控制、创建和（或）纳米级水平上组织材料的组装[208~210]。这些材料可用来作为构建较大设备和系统的建筑材料[211~214]。预计纳米技术将在很多学科，包括化学、物理、生物、医药、材料科学、工程技术和计算机技术中发挥关键作用。

几个因素的结合，使φ29 pRNA 在纳米技术和其他领域的应用成为理想的选择。它易于再生，就像最近开发的体外φ29 DNA 的包装系统所证明的一样，从而，将纯化原衣壳、gp16 和 pRNA，能够包装高达 90%的 DNA-gp3[78]。这个过程已应用于用光阱对 DNA 易位力的定量测定[199,215]。通过这种方法，φ29 DNA 包装马达被确认为，具有 57pN 静扭矩力的已知最强的纳米马达[199]。然而，或许最重要的是，φ29 pRNA 易操作和可控，强烈产生二聚体、三聚体和六聚体形成的相互作用趋向。互补环序列产生过程，允许预确定 pRNA 多聚体的形成，构建更大结构和更大系统的早期修饰。pRNA 的两个结构域相互独立和严格的自我折叠。多达 120 个核苷酸可以从 pRNA 的 3′端延伸，而不会妨碍其原衣壳结合或 DNA 包装活性[216,217]。

13.4.2 马达 pRNA 多价基因递送系统

抗原检测和 Southern 印迹分析证明，φ29 pRNA 可以伴侣和护送锤头状核酶在细胞中起作用，提高切割效率和核酶对乙型肝炎病毒的抑制作用。这种增加核酶活性有希望提高 pRNA，防止核酶错误折叠和保护其免受核酸外切酶降解的能力。已成功地证明，

外源性 RNA 可以连接到 pRNA 的末端，不会影响 pRNA 折叠。至少 120 个非特异性碱基可以从 aptRNA 的 3′端延长，而不妨碍 pRNA 折叠和功能，证明从它的 3′端延长的 117 个碱基 pRNA 是独立折叠。这些发现表明，治疗性 RNA 分子可以放置在 pRNA 的 3′端和 5′端之间，而不受原始 pRNA 序列的干扰。

φ29 pRNA 强烈趋向于二聚体[158,162,174,218]的形成，二聚体是六聚体[164,175,176,200]初级构建材料。单体和二聚物的形成可以通过两个相互作用环序列的操作和控制来操纵[158,162,174,176,218]。pRNA 二聚体的形成也可协助稳定 pRNA/核酶嵌合分子。只要循环扭曲 pRNA 的开口足够接近二聚体形成的区域，该三级结构可以帮助防止核酸外切酶访问 RNA 分子的端部。

二聚体和六聚体的形成也有助于多重治疗剂的递送。例如，六聚体的 pRNA 亚基之一，可携带锤头状核酶和其他 pRNA 亚基并可以携带一个发夹状核酶或反义 RNA。多重治疗剂的应用程序可以提高体内治疗效率。pRNA 多价亚基表现出，方便特异性靶向和核酶递送的强大潜力。例如，一个亚基可以用于携带与细胞表面受体相互作用的 RNA 分子。二聚体或六聚体对 pRNA 的特异性受体的结合，将使 RNA 复合物通过细胞内吞作用特异性递送至细胞。与特异性受体结合的 RNA 分子，可通过指数富集的配基系统进化技术（SELEX）进行分离[219,220]。从含有随机序列的 RNA 库开始，体外进化技术，允许选择能够与特定配体或受体结合的 RNA 分子[221~224]。如先前报道的一样，携带锤头状核酶的嵌合 RNA 和携带反受体的嵌合 RNA，可以混合经由内 RNA 环/环的相互作用形成二聚体[164,175,176,200]。

13.4.3 DNA 包装马达作为 DNA 测序仪或分子分类仪

生物学感兴趣的另一个新兴领域是，开发用于探测和处理单分子的高效敏感分析工具。鉴于最近的作图细菌项目，人类和其他哺乳动物的基因组、新类型的阵列和方法学都需要分析、解释并有效和价廉地利用基因组信息。科学家正在开发基于纳米孔的 DNA 测序设备[225]。这种设备通过与孔中的 DNA 的碱基之间的相互作用所产生的电信号，识别单个碱基对。类似的概念可能对其他生物分子的单分子分析是有用的。φ29 DNA 包装马达有潜力发展成为一种 DNA 测序装置，因为 DNA 的包装过程包括穿过 3.6nm 孔径的 DNA 运动，该孔径由修饰而接受化学信号或电信号的 6 个 RNA 所包围。

13.4.4 其他生命系统中 RNA 二聚体和三聚体的研究模型

已分离获得无蛋白质稳定的 pRNA 二聚体和三聚体[164]。二聚化/三聚化实验为 pRNA 复合物结构性研究和 RNA/RNA 相互作用的机制探索，提供了简单而稳定的系统。已经发现，RNA 二聚作用和寡聚作用，在许多生命系统中发挥着重要作用。逆转录病毒基因组 RNA 的二聚作用，是逆转录病毒生命周期许多阶段，包括翻译、逆转录、RNA 衣壳

化和病毒装配的关键步骤[226~228]。例如，RNA-RNA 分子间的相互作用，必须形成特异性核糖核蛋白颗粒，即果蝇的前决定因子 mRNA 3′ UTR-STAUFEN，它确定果蝇胚胎[229]的前轴形体的形成。RNA-RNA 相互作用，也是 tRNA 上核糖核酸酶 P 裂解反应的一个重要步骤[230~232]。质粒 ColE1 的复制是通过互补 RNA 茎环相互作用形成复合物的质粒专一性小 RNA（RNA Ⅰ 和 RNA Ⅱ）进行调节[233]。

13.4.5　新的抗病毒策略设计模型

广泛研究证明，双链 DNA 病毒的 DNA 包装，在病毒生命周期的这一步有某些共同的特点。共性包括使用一对非衣壳酶，将病毒 DNA 易位到原衣壳与 ATP 水解[28~30,38,59,143,152,191,234~236]偶联。相似的双链 DNA 噬菌体和疱疹病毒、腺病毒、细小病毒和痘病毒之间 DNA 的包装（如 13.1 节提到的）研究证明，使用φ29 作为新的抗病毒策略的设计模型系统。以φ29 pRNA 作为靶，用几种方法对病毒组装的抑制进行了建模[170,171,173]。

13.4.5.1　反义 DNA 体外靶向 pRNA φ29 组装的抑制

反义寡核苷酸包括反义 RNA 和反义 DNA。它们体积小、标准、单链的多核苷酸，与特异性靶互补区结合以便控制它们的生物功能。反义 DNA 与 pRNA 结合并引起 pRNA 电泳迁移率的变化[170]。通过凝胶移位测定，反义 DNA 寡核苷酸显示出与φ29 pRNA 杂交[170]。

φ29 pRNA 包含两个功能域。一个域位于中央区域，为原衣壳结合所需。其他结构域由配对的 5′端和 3′端组成，DNA 转运到原衣壳所需要，但原衣壳结合不需要这个结构域。寡 P6 靶向原衣壳结合结构域的左侧环，可以阻止 pRNA 与原衣壳的结合，导致φ29 组装的体外抑制作用。寡聚 P11 和 P15 分别靶向任一 pRNA 的 5′端或 3′端，不抑制 pRNA 与原衣壳结合，但强烈抑制 DNA 包装[166,170]。

13.4.5.2　用突变体 pRNA 体外组装φ29 的完全抑制

φ29 作为探索超越体外抑制，与针对 pRNA 反义寡核苷酸抗病毒研究新途径的模型。正如已经指出的那样，pRNA 包含两个功能域。中断 DNA 的转位结构域在 5′/3′端碱基配对的序列改变，产生在体外噬菌体装配期完全失活的突变体 pRNA，但仍保留野生型原衣壳的结合亲和力[159,166,172,173]。这些突变体 pRNA 能够与野生型 pRNA 竞争，在体外和体内[173]与原衣壳结合，并有效抑制病毒组装。

对于体内研究而言，构建质粒表达 3′端 4 碱基突变的 pRNA，并转化到宿主细胞中。容纳质粒的细胞完全抗野生型φ29 形成的空斑。这里获得十分有趣的“圆满”抑制结果表明，参与病毒装配的因子，能用于有效和特异性靶向抗病毒治疗。这种高效率的水平来自两个关键特性。首先，由于两个结构域十分不同并分离，包装结构域突变导致 pRNA 无 DNA 包装活性，但原衣壳结合的能力保持不变。其次，6 个 pRNA 参加一个基因组的

包装。pRNA 这种高级依赖性导致相对高级的抑制效果，因为仅仅阻断 1/6 位置就导致病毒粒子的组装完全停止[172]。使用含有两个功能域分子和需要多个拷贝参与作为抑制剂的原理，采用某些病毒结构蛋白、酶和在病毒生命周期中涉及的其他 RNA，可以应用于基因治疗、细胞内的免疫接种、抗病毒的药物设计和抗病毒感染的转基因植物构建。

13.4.6 病毒 DNA 易位和其他核酸滑动/骑行过程之间的类似机制

有一组核酸结合蛋白，它们在与 DNA 复制、易位、重组、RNA 包装和 RNA 的转录相关的 DNA 或 RNA 滑动或骑行中担当[175,237~240]类似的作用。该组蛋白质可细分为两个子集：结合核酸的蛋白质和在核酸上作用的蛋白质。两个子集主要共同特征是，它们与聚合物构象中的 RNA 或 DNA 相互作用，并与环形形态 RNA 或 DNA 相互作用。在该组中大部分蛋白质也是六聚体。

在核酸上作用的子集包括解旋酶[241,242]、大肠杆菌转录终止蛋白 Rho[243,244]、酵母 DNA 聚合酶延伸因子[245]、牛乳头瘤病毒 E1 复制启动子[246]、大肠杆菌 DNA 聚合酶III全酶[247,248]和双链 RNA 包装马达[239,240]等均以六聚体存在[241,249~250]。尽管这种 DNA-蛋白质相互作用的机制尚未阐明，但发现，DNA 易位期间 6 个拷贝 pRNA 加到六重对称的连接器中表明，这些六聚体可能有一些共同的东西。病毒 DNA 包装和 DNA（或 RNA）的复制（或 RNA 的转录）两个过程涉及两个组分的相对运动，其中之一就是核酸。令人感兴趣的是，证明 pRNA 可能类似蛋白酶，如 DNA-解旋酶或终止因子 Rho 一样起作用。

13.4.7 大分子穿过细胞膜易位机制的见解

大分子如蛋白质或核酸通过屏障或细胞膜迁移或运输，是在生命系统中共同的过程。细胞核转录后，mRNA 和 tRNA 必须穿过核膜到达细胞质中的翻译机器。核蛋白同样必须通过，从合成它们的细胞质到它们起作用的细胞核。感染或转染后，大多数病毒或质粒 DNA 必须穿过核膜以作为基因表达的模板。人类免疫缺陷病毒的病毒颗粒蛋白表达调节因子 Rev 蛋白，有助于病毒 mRNA 通过核孔从细胞核向细胞质易位。各种蛋白质和其他元素迁移进入和离开细胞与细胞核来执行各自的功能。示踪实验也证明，分子迁移或易位，增强子或转录因子沿着 DNA 轨道骑行（rail riding），转录终止蛋白 Rho 沿 RNA 易位，并且在 DNA 复制期间，解旋酶沿着单链 DNA 进行迁移[241]。

其中多数复合物和错综复杂的易位过程，是病毒 DNA 包入衣壳内的过程。DNA 衣壳化的研究为大分子透过细胞膜易位提供了有用的提示。

13.5 结　论

φ29 DNA 包装马达作为一种双链 DNA 病毒包装研究有效的模型。利用纯化的φ29 成分体外包装系统定义的发展，有助于对φ29 包装特异性质和 DNA 普通包装的进一步研

究。这将为许多方面，包括靶向递送到细胞的治疗剂、单分子精确测序技术及将各马达部件直接连接到纳米设备等提供技术支撑。此外，φ29 的强烈倾向形成的二聚体、三聚体、六聚体等有可能被驾驭，并利用来构建有广泛技术潜力的自组装阵列，包括开发超高密度存储器系统，并在医学诊断中提取与分离多种病原体。正在深入研究的专一性马达部件和综合马达功能，使这些重要的目标变得越来越现实。

致谢

我要感谢 Jeremy Hall 在准备手稿期间所做出的贡献。感谢美国国立卫生研究院生物学和医学纳米科学和纳米技术项目 EB3730 中的 GM59944 和 GM60529 项目、国家科学基金会 MCB-9723923 项目对作者实验室的资助和支持。

参 考 文 献

[1] Kerr, C. and Sadowski, P. D. (1974) Packaging and maturation of DNA of bacteriophage T7 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3545–3549.

[2] Kaiser, A. D., Syvanen, M., and Masuda, T. (1975) DNA packaging steps in bacteriophage lambda head assembly. *J. Mol. Biol.* 91, 175–186.

[3] Pruss,G.J.,Wang, J.C., and Calendar, R. (1975) *Invitro* pack aging of covalently closed monomers of bacteriophage DNA. *J. Mol. Biol.* 98, 465–478.

[4] Hohn, B. (1975) DNA as substrate for packaging into bacteriophage lambda, in vitro. *J. Mol. Biol.* 98, 93–106.

[5] Bjornsti, M. A., Reilly, B. E., and Anderson, D. L. (1983) Morphogenesis of bacteriophage 29 of *Bacillus subtilis*: oriented and quantized *in vitro* packaging of DNA protein gp3. *J. Virol.* 45, 383–396.

[6] Gope, R. and Serwer, P. (1983) Bacteriophage P22 in vitro DNA packaging monitored by agarose gel electrophoresis: rate of DNA entry into capsids. *J. Virol.* 47, 96–105.

[7] Hamada, K., Fujisawa, H., and Minagawa, T. (1986) A defined *in vitro* system for packaging of bacteriophage T3 DNA. *Virology* 151, 119–123.

[8] Guo, P., Grimes, S., and Anderson, D. (1986) A defined system for in vitro pack-aging of DNA-gp3 of the *Bacillus subtilis* bacteriophage φ29. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3505–3509.

[9] Serwer, P. (1988) The source of energy for bacteriophage DNA packaging: an osmotic pump explains the data. *Biopolymers* 27, 165–169.

[10] Furth, P. A., Hennighausen, L., Baker, C., Beatty, B., and Woychick, R. (1991) The variability in activity of the universally expressed human cytomegalovirus immediate early gene 1 enhancer/promoter in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* 19, 6205–6208.

[11] Graeble, M. and Hearing, P. (1992) *Cis* and *trans* requirements for the selective packaging of adenovirus type 5 DNA. *J. Virol.* 66, 723–731.

[12] Higgins, R. R. and Becker, A. (1995) Interaction of terminase, the DNA packaging enzyme of phage λ, with its cos DNA substrate. *J. Mol. Biol.* 252, 31–45.

[13] Hang, J. Q., Catalano, C. E., and Feiss, M. (2001) The functional asymmetry of cosN, the nicking site for bacteriophage lambda DNA packaging, is dependent on the terminase binding site, cosB. *Biochemistry* 40, 13, 370–13, 377.

[14] Hohn, T. (1976) Packaging of genomes in bacteriophages: a comparison of ssRNA bacteriophages and dsDNA bacteriophages. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B* 276, 143–150.

[15] Serwer, P. (2003) Models of bacteriophage DNA packaging motors. *J. Struct. Biol.* 141, 179–188.

[16] Earnshaw, W. C. and Casjens, S. R. (1980) DNA packaging by the double-strand ed DNA bacteriophages. *Cell* 21, 319–331.

[17] Huang, L. P. and Guo, P. (2003) Use of acetone to attain highly active and soluble DNA packaging protein gp16 of phi29 for ATPase assay. *Virology* 312(2), 449–457.

[18] Hwang, J. S. and Bogner, E. (2002) ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *J. Biol. Chem.* 277, 6943–6948.

[19] Hwang, Y., Hang, J. Q., Neagle, J., Duffy, C., and Feiss, M. (2000) Endo-nuclease and helicase activities of bacteriophage lambda terminase: changing nearby residue 515 restores activity to the gpA K497D mutant enzyme. *Virology* 277, 204–214.

[20] Catalano, C. E. (2000) The terminase enzyme from bacterio phage lambda: a DNA-packaging machine. *Cell Mol. Life Sci.* 57, 128–148.

[21] Dasgupta, A. and Wilson, D. W. (1999) ATP depletion blocks herpes simplex virus DNA packaging and capsid maturation. *J. Virol.* 73(3), 2006–2015.

[22] Rubinchik, S., Parris, W., and Gold, M. (1994) The in-vitro ATPases of bacterio-phage-lambda terminase and its large subunit, gene-product-A—the relationship with their DNA helicase and packaging activities. *J. Biol. Chem.* 269, 13, 586– 13, 593.

[23] Tomka, M. A. and Catalano, C. E. (1993) Kinetic characterization of the ATPase activity of the DNA packaging enzyme from bacteriophage lambda. *Biochemistry* 32, 11, 992–11, 997.

[24] Koonin, E. V., Senkhvich, T. G., and Chernos, V. I. (1993) Gene A32 product of vaccinia virus may be an ATPase involved in viral DNA packaging as indicated by sequence comparisons with other putative viral ATPases. *Virus Genes* 7, 89–94.

[25] Morita, M., Tasaka, M., and Fujisawa, H. (1993) DNA packaging ATPase of bacteriophage T3. *Virology* 193, 748–752.

[26] Hamada, K., Fujisawa, H., and Minagawa, T. (1987) Characterization of ATPase activity of a defined in vitro system for packaging of bacteriophage T3 DNA. *Virology* 159, 244–249.

[27] Guo, P., Peterson, C., and And erson, D. (1987) Prohead and DNA-gp3-dependent ATPase activity of the DNA packaging protein gp16 of bacteriophage φ29. *J. Mol. Biol.* 197, 229–236.

[28] Javey, A., Guo, J., Wang, Q., Lundstrom, M., and Dai, H. (2003) Ballistic carbon nanotube field-effect transistors. *Nature* 424, 654–657.

[29] Zuker, M. (1989) On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* 244, 48–52.

[30] Casjens, S. (1985) Nucleic acid packaging by viruses in *Virus Structure and Assembly* (Casjens, S., ed.), Jones & Bartlett, Portola Valley, California, pp. 75–147. 31.

[31] Black, L. W. (1989) DNA Packaging in dsDNA bacteriophages. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 267–292.

[32] Bazinet, C. and King, J. (1985) The DNA translocation vertex of dsDNA bacteriophages. *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 109–129.

[33] And erson, D. L. and Reilly, B. (1993) Morphogenesis of bacteriophage φ29, in Bacillus subtilis *and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics* (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R., eds.), American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 859–867.

[34] Rao, V. B. and Black, L. W. (1988) Cloning, overexpression and purification of the terminase proteins gp16 and gp17 of bacteriophage T4: construction of a defined *in vitro* DNA packaging system using purified terminase proteins. *J. Mol. Biol.* 200, 475–488.

[35] Becker, A. and Gold, M. (1988) Prediction of an ATP reactive center in the small subunit, gpNul of phage lambda terminase enzyme. *J. Mol. Biol.* 199, 219–222.

[36] Catalano, C. E., Cue, D., and Feiss, M. (1995) Virus DNA packaging: the strategy used by phage lambda. *Mol. Microbiol.* 16, 1075–1086.

[37] Yamada, M., Fujisawa, H., Kato, H., Hamada, K., and Minagawa, T. (1986) Cloning and sequencing of the genetic right end of bacteriophage T3 DNA. *Virology* 151, 350–361.

[38] Son, M., Hayes, S. J., and Serwer, P. (1988) Concatemerization and packaging of bacteriophage T7 DNA *in vitro*: determination of the concatemers' length and appearance kinetics by use of rotating gel electrophoresis. *Virology* 162, 38–46.

[39] Dunn, J. J. and Studier, F. W. (1983) Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J. Mol. Biol.* 166, 477–535.

[40] Feiss, M., Frackman, S., and Sippy, J. (1985) Essential inter action between lambdoid phage 21 terminase and the E. coli integrative host factor. *J. Mol. Biol.* 183, 239–249.

[41] Casjens, S., Huang, W. M., Hayden, M., and Parr, R. (1987) Initiation of bacteriophage P22 DNA packaging series: analysis of a mutant which alters the DNA target specificity of the packaging apparatus. *J. Mol. Biol.* 194, 411–422.

[42] Prasad, B. V. V., Prevelige, P. E., Marietta, E., Chen, R. O., Thomas, D., King, J., and Chiu, W. (1993) Three-dimensional transformation of capsids associated with genome packaging in a bacterial virus. *J. Mol. Biol.* 231, 65–74.

[43] Galisteo, M. and King, J. (1993) Conformational transformations in the protein lattice of phage P22 procapsids. *Biophys. J.* 65, 227–235.

[44] Skorupski, K., Pierce, J. C., Sauer, B., and Sternberg, N. (1992) Bacteriophage P1 genes involved in the recognition and cleavage of the phage packaging site (pac). *J. Mol. Biol.* 223, 977–989.

[45] Pfister, P., Wasserfallen, A., Stettler, R., and Leisinger, T. (1998) Molecular analysis of Methanobacterium phage psiM2. *Mol. Microbiol.* 30, 233–244.

[46] Desiere, F., Lucchini, S., and Brussow, H. (1998) Evolution of Streptococcus thermophilus bacteriophage genomes by modular exchanges followed by point mutations and small deletions and insertions. *Virology* 241, 345–356.

[47] Newcomb, W. W., Juhas, R. M., Thomsen, D. R., Homa, F. L., Burch, A. D., Weller, S. K., and Brown, J. C. (2001) The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *J. Virol.* 75, 10, 923–10, 932.

[48] Yu, D.and Weller, S. K. (1998) Generic analysis of the UL15 gene locus for the putative terminase of herpes simplex virus type 1. *Virology* 243, 32–44.

[49] Salmon, B. and Baines, J. D. (1998) Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging: association of multiple forms of U(L)15-encoded proteins with B capsids requires at least the U(L)6, U(L)17, and U(L)28 genes. *J. Virol.* 72, 3045–3050.

[50] Scheffczik, H., Savva, C. G., Holzenburg, A., Kolesnikova, L., and Bogner, E. (2002) The terminase subunits pUL56 and pUL89 of human cytomegalovirus are DNA-metabolizing proteins with toroidal structure. *Nucleic Acids Res.* 30, 1695–1703.

[51] Schmid, S. I. and Hearing, P. (1997) Bipartite structure and functional independence of adenovirus type 5 packaging elements. *J. Virol.* 71, 3375–3384.

[52] Bett, A., Prevec, L., and Graham, F. (1993) Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J. Virol.* 67, 5911–5921.

[53] Zhang, W., Low, J. A., Christensen, J. B., and Imperiale, M. J. (2001) Role for the adenovirus IVa2 protein in packaging of viral DNA. *J. Virol.* 75, 10, 446– 10, 454.

[54] Koonin, E. V., Senkevich, V. I., and Chernos, V. I. (1993) Gene A32 product of vaccinia virus may be an ATPase involved in viral DNA packaging as indicated by sequence comparisons with other putative viral ATPases. *Virus Genes* 7, 89–94.

[55] Cassetti, M. C., Merchlinsky, M., Wolffe, E. J., Weiserg, A. S., and Moss, B. (1998) DNA package mutant: repression of the vaccinia virus A32 gene results in noninfectious, DNA-deficient, spherical, enveloped particles. *J. Virol.* 72(7), 5769–5780.

[56] Feiss, M., Sippy, J., and Miller, G. (1985) Processive action of terminase during sequential packaging of bacteriophage lambda chromosomes. *J. Mol. Biol.* 186, 759–771.

[57] Frackman, S., Siegele, D. A., and Feiss, M. (1984) A functional domain of bacteriophage λ terminase for prohead binding. *J. Mol. Biol.* 183, 283–300.

[58] Frackman, S., Siegele, D. A., and Feiss, M. (1985) The terminase of bacterio-phage λ: functional domains for *cosB*

binding and multimer assembly. *J. Mol. Biol.* 180, 283–300.

[59] Shibata, H., Fujisawa, H., and Minagawa, T. (1987) Early events in a defined *in vitro* system for packaging of bacteriophage T3 DNA. *Virology* 159, 250–258.

[60] Shibata, H., Fujisawa, H., and Minagawa, T. (1987) Characterization of the bacteriophage T3 DNA packaging reaction *in vitro* in a defined system. *J. Mol. Biol.* 196, 845–851.

[61] Shinder, G. and Gold, M. (1988) The Nu1 subunit of bacteriophage lambda terminase binds to specific sites in *cos* DNA. *J. Virol.* 62, 387–392.

[62] Sternberg, N. and Coulby, J. (1987) Recognition and cleavage of the bacteriophage P1 packaging site (*pac*). Ⅰ. Differential processing of the cleaved ends *in vivo*. *J. Mol. Biol.* 194, 453–468.

[63] Sternberg, N. and Coulby, J. (1987) Recognition and cleavage of the bacteriophage P1 packaging site (*pac*). Ⅱ. Functional limits of *pac* and location of *pac* cleavage termini. *J. Mol. Biol.* 194, 469–479.

[64] Wu, W.-F., Christiansen, S., and Feiss, M. (1988) Domains for protein-protein interactions at the N and C termini of the large subunit of bacteriophage λ terminase. *Genetics* 119, 477–484.

[65] Pruss, G. and Calendar, R. (1978) Maturation of bacteriophage P2 DNA. *Virology* 86, 454–467.

[66] Bowden, D. W. and Calendar, R. (1979) Maturation of bacteriophage P2 DNA *in vitro*: a complex, site-specific system for DNA cleavage. *J. Mol. Biol.* 129, 1–18.

[67] Bowden, D. W. and Modrich, P. (1985) *In vitro* maturation of circular bacteriophage P2 DNA: purification of *ter* components and characterization of the reaction. *J. Biol. Chem.* 260, 6999–7007.

[68] Backhaus, H. (1985) DNA packaging initiation of *Salmonella* bacteriophage P22: determination of cut sites within the DNA sequence coding for gene 3. *J. Virol.* 55, 458–465.

[69] Poteete, A. R. and Botstein, D. (1979) Purification and properties of proteins essential to DNA encapsidation by phage 22. *Virology* 95, 565–573.

[70] Schmieger, H. and Koch, E. (1987) *In vitro* assay of packaging protein gp3 of *Salmonella* phage P22. *Intervirology* 28, 157–162.

[71] Strobel, E., Behnish, W., and Schmieger, H. (1984) *In vitro* packaging of mature phage DNA by *Salmonella* phage P22. *Virology* 133, 158–165.

[72] Sun, M., Louie, D., and Serwer, P. (1999) Single-event analysis of the packaging of bacteriophage T7 DNA concatemers in vitro. *Biophys. J.* 77(3), 1627–1637.

[73] Endy, D., Kong, D., and Yin, J. (1997) Intracellular kinetics of a growing virus: a genetically structured simulation for bacteriophage T7. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 375–389.

[74] Guo, P., Bailey, S., Bodley, J. W., and And erson, D. (1987) Characterization of the small RNA of the bacteriophage φ29 DNA packaging machine. *Nucleic Acids Res.* 15, 7081–7090.

[75] Shu, D. and Guo, P. (2003) A viral RNA that binds ATP and contains an motif similar to an ATP-binding aptamer from SELEX. *J. Biol. Chem.* 278(9), 7119– 7125.

[76] Bjornsti, M. A., Reilly, B. E., and And erson, D. L. (1982) Morphogenesis of bacteriophage φ29 of *Bacillus subtilis*: DNA-gp3 intermediate in *in vivo* and *in vitro* assembly. *J. Virol.* 41, 408–517.

[77] Prieto, I., Lázaro, J. M., García, J. A., Hermoso, J. M., and Salas, M. (1984) Purification in a functional form of the terminal protein of Bacillus subtilis phage φ29. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1639–1643.

[78] Deiss, L. and Frenkel, N. (1986) Herpes simplex virus amplicon: cleavage of concatemeric DNA is linked to packaging and involves amplification of the ter- minally reiterated a sequence. *J. Virol.* 57, 933–941.

[79] Newcomb, W. W., Brown, J. C., Booy, F. P., and Steven, A. C. (1989) Nucleocapsid mass and capsomer protein stoichiometry in equine herpesvirus 1: scanning transmission electron microscopic study. *J. Virol.* 63, 3777–3783.

[80] Lee, J. Y., Irmiere, A., and Gibson, W. (1988) Primate cytomegalovirus assembly: evidence that DNA packaging occurs subsequent to B capsid assembly. *Virology* 167, 87–96.

[81] Guo, P., Scholz, E., Turek, J., Nordgren, R., and Maloney, B. (1993) Assembly pathway of avian infectious laryngotracheitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 54, 2031–2039.

[82] Gibson, W. and Roizman, B. (1972) Proteins specified by herpes simplex virus 8. Characterization and composition

of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2. *J. Virol.* 10, 1044–1052.

[83] Booy, F. P., Newcomb, W. W., Trus, B. L., Brown, J. C., Baker, T. S., and Steven, A. C. (1991) Liquid-crystalline, phage-like packaging of encapsidated DNA in herpes simplex virus. *Cell* 64, 1007–1015.

[84] Wieczorek, D. J. and Feiss, M. (2001) Defining cos Q, thesiterequiredfortermi- nation of bacteriophage lambda DNA packaging. *Genetics* 158, 495–506.

[85] McNabb, D. S. and Courtney, R. J. (1992) Analysis of the UL36 open reading frame encoding the large tegument protein (ICP1/2) of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 66, 7581–7584.

[86] DeLange, A. M., Reddy, M., Scraba, D., Upton, C., and McFadden, G. (1986) Replication and resolution of cloned poxvirus telomeres *in vivo* generates linear minichromosomes with intact viral hairpin termini. *J. Virol.* 59, 249–259.

[87] Parsons, B. L. and Pickup, D. J. (1990) Transcription of orthopoxvirus telomeres at late times during infection. *Virology* 175, 69–80.

[88] Moss, B. (1990) Poxviridae and their replication, in *Virology* (Fields, B. N. and Knipe, D. M., eds.), Raven, New York, pp. 2079–2111.

[89] Zhang, W. and Imperiale, M. J. (2000) Interaction of the adenovirus IVa2 protein with viral packaging sequences. *J. Virol.* 74, 2687–2693.

[90] Casjens, S. and Hendrix, R. (1988) Control mechanisms in dsDNA bacteriophage assembly, in *The Bacteriophages*, vol. 1. (Calendar, R., ed.), Plenum, New York, pp. 15–92.

[91] Guo, P. (1994) Introduction: principles, perspectives, and potential applications in viral assembly. *Semin. Virol.* 5(1), 1–3.

[92] Hendrix, R. W. and Garcea, R. L. (1994) Capsid assembly of dsDNA viruses. *Semin. Virol.* 5, 15–26.

[93] Guo, P., Erickson, S., and And erson, D. (1987) A small viral RNA is required for *in vitro* packaging of bacteriophage φ29 DNA. *Science* 236, 690–694.

[94] Guo, P., Peterson, C., and Anderson, D. (1987) Initiation events in *in vitro* packaging of bacteriophage φ29 DNA-gp3. *J. Mol. Biol.* 197, 219–228.

[95] Guo, P., Erickson, S., Xu, W., Olson, N., Baker, T. S., and And erson, D. (1991) Regulation of the phage φ29 prohead shape and size by the portal vertex. *Virology* 183, 366–373.

[96] Guo, P., Rajogopal, B., And erson, D., Erickson, S., and Lee, C.-S. (1991) sRNA of bacteriophage φ29 of *B. subtilis* mediates DNA packaging of φ29 proheads assembled in *E. coli*. *Virology* 185, 395–400.

[97] Lee, C.S.and Guo, P. (1995) *In vitro* assembly of infectious virions of ds-DNA phage φ29 from cloned gene products and synthetic nucleic acids. *J. Virol.* 69, 5018–5023.

[98] Lee, C.S. and Guo, P. (1994) A highly sensitive system for the in vitro assembly of bacteriophage φ29 of *Bacillus subtilis*. *Virology* 202, 1039–1042.

[99] Tonegawa, S. and Hayashi, M. (1970) Intermediates in the assembly of fX174. *J. Mol. Biol.* 48, 219–242.

[100] Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

[101] Laemmli, U., Molbert, E., Showe, M., and Kellenberger, E. (1970) Form determining function of the genes required for the assembly of the bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 49, 99–113.

[102] Kaiser, D. and Masuda, T. (1973) *In vitro* assembly of bacteriophage lambda heads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 260–264.

[103] King, J. and Casjens, S. (1974) Catalytic head assembly protein in virusmorpho-genesis. *Nature* 251, 112–119.

[104] Israel, J. V., And erson, T. H., and Levine, M. (1967) In vitro morphogenesis of phage p22 from heads and base-plate parts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57, 284–291.

[105] Becker, A., Marko, M., and Gold, M. (1977) Early events in the in vitro packaging of bacteriophage DNA. *Virology* 78, 291–305.

[106] Miyazaki, J., Fugisawa, H., and Minagawa, T. (1978) Biological activity of purified bacteriophage T3 prohead and prohead-like structures as precursors for *in vitro* head assembly. *Virology* 91, 283–290.

[107] Mettenleiter, T. and Rauh, I. (1990) A glycoprotein gX-β-galactosidase fusion gene as insertional marker for rapid

identification of pseudorabies virus mutants. *J. Virol. Methods* 30, 55–66.

[108] Poteete, A. R., Jarvik, V., and Botstein, D. (1979) Encapsulation of phage P22 DNA *in vitro*. *Virology* 95, 550–564.

[109] Bjornsti, M. A., Reilly, B. E., and Anderson, D. L. (1981) In vitro assembly of the Bacillus subtilis bacteriophage φ29. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5861–5865.

[110] Fuller, M. and King, J. (1982) Assembly in vitro of bacteriophage P22 procapsids from purified coat and scaffolding subunits. *J. Mol. Biol.* 156, 633–665.

[111] Aoyama, A., Hamatake, R. K., and Hayashi, M. (1983) *In vitro* synthesis of bacte- riophage φX174 by purified components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4195–4199.

[112] Hwang, Y. and Feiss, M. (1997) A defined system for in vitro lambda DNA packaging. *Virology* 211, 367–376.

[113] Kellenberger, E. and Wunderli-Allenspach, H. (1995) Electron microscopic studies on intracellular phage development—history and perspectives. *Micron* 26, 213–245.

[114] Tao, Y., Olson, N. H., Xu, W., And erson, D. L., Rossmann, M. G., and Baker, T. S. (1998) Assembly of a tailed bacterial virus and its genome release studied in three dimensions. *Cell* 95, 431–437.

[115] Lee, C. S. and Guo, P. (1995) Sequential interactions of structural proteins in phage φ29 procapsid assembly. *J. Virol.* 69, 5024–5032.

[116] Murialdo, H. and Becker, A. (1977) Assembly of biologically active proheads of bacteriophage lambda in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 906–910.

[117] Shaw, J.E. and Murialdo, H. (1980) Morphogenetic genes C and Nu3 overlap in bacteriophage lambda. *Nature* 283, 30–35.

[118] Katsura, I. (1983) Structure and inherent properties of bacteriophage lambda head shell. IV. Small head mutants. *J. Mol. Biol.* 171, 297–317.

[119] Katsura, I. (1986) Structure and inherent propertiesof the bacteriophage lambda head shell. V. Amber mutants in gene E. *J. Mol. Biol.* 190, 577–586.

[120] Katsura, I. (1989) Structure and inherent properties of the bacteriophage lambda head shell. VI. DNA packaging defective mutants in the major capsid protein. *J. Mol. Biol.* 205, 397–405.

[121] Mindich, L., Qiao, X., Qiao, J., Onodera, S., Romantschuk, M., and Hoogstraten, D. (1999) Isolation of additional bacteriophages with genomes of segmented double-strand ed RNA. *J. Bacteriol.* 181, 4505–4508.

[122] Traub, F. and Maeder, M. (1984) Formation of the prohead core of bacteriophage T4 *in vivo*. *J. Virol.* 49, 892–901.

[123] Traub, F., Keller, B., Kuhn, A., and Maeder, M. (1984) Isolation of the prohead core of bacteriophage T4 after cross-linking and determination of protein composition. *J. Virol.* 49, 902–908.

[124] Kuhn, A., Keller, B., Maeder, M., and Traub, F. (1987) Prohead core of bacteriophage T4 can act as an intermediate in the T4 head assembly pathway. *J. Virol.* 61, 113–118.

[125] Thomsen, D. R., Roof, L. L., and Homa, F. L. (1994) Assembly of herpes simplex virus (HSV) intermediate capsids in insect cells infected with recombinant baculoviruses expressing HSV capsid proteins. *J. Virol.* 68, 2442–2457.

[126] Tatman, J. D., Preston, V. G., Nicholson, R. M., Elliott, R. M., and Rixon, F. J. (1994) Assembly of herpes simplex virus type 1 capsids using a panel of recombinant baculoviruses. *J. Gen. Virol.* 75, 1101–1113.

[127] Newcomb, W., Homa, F. L., Thomsen, D. L., Ye, Z., and Brown, J. (1994) Cell-free assembly of the herpes simplex capsid. *J. Virol.* 68, 6059–6063.

[128] Guasch, A., Pous, J., Ibarra, B., Gomis-Ruth, F. X., Valpuesta, J. M., Sousa, N., Carrascosa, J. L., and Coll, M. (2002) Detailed architecture of a DNA translocating machine: the high-resolution structure of the bacteriophage phi29 connector particle. *J. Mol. Biol.* 315, 663–676.

[129] Simpson, A.A., Tao, Y., Leiman, P.G., et al. (2000) Structure of the bacteriophage phi29 DNA packaging motor. *Nature* 408, 745–750.

[130] Valpuesta, J. M., Fujisawa, H., Marco, S., Carazo, J. M., and Carrascosa, J. (1992) Three-dimensional structure of T3 connector purified from overexpressing bacteria. *J. Mol. Biol.* 224, 103–112.

[131] Rishovd, S., Holzenburg, A., Johansen, B. V., and Lindqvist, B. H. (1998) Bacteriophage P2 and P4 morphogenesis: structure and function of the connector. *Virology* 245, 11–17.

[132] Kochan, J., Carrascosa, J. L., and Murialdo, H. (1984) Bacteriophage lambda preconnectors: purification and structure. *J. Mol. Biol.* 174, 433–447.

[133] Donate, L. E., Herranz, L., Secilla, J. P., Carazo, J. M., Fujisawa, H., and Carrascosa, J. L. (1988) Bacteriophage T3 connector: three-dimensional structure and com- parison with other viral head-tail connecting regions. *J. Mol. Biol.* 201, 91–100.

[134] Hendrix, R. W. (1978) Summetry mismatch and DNA packaging in large bacte- riophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4779–4783.

[135] Chen, C. and Guo, P. (1997) Sequential action of six virus-encoded DNA-packaging RNAs during phage phi29 genomic DNA translocation. *J. Virol.* 71, 3864– 3871.

[136] Salas, M. (1988) Phages with protein attached to the DNA ends, in *The Bacteriophages*, vol. 1 (Calendar, R., ed.), Plenum, New York, pp. 169–191.

[137] Bravo, A., Hermoso, J. M., and Salas, M. (1994) In vivo functional relationships among terminal proteins of Bacillus subtilis φ29-related phages. *Gene* 148, 107–112.

[138] Blanco, L., Lazaro, J. M., de Vega, M., Bonnin, A., and Salas, M. (1994) Terminal protein-primed DNA amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91,12,198–12,202.

[139] Salas, M. (1991) Protein-priming of DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 39–71.

[140] Bravo, A., Hermoso, J. M., and Salas, M. (1994) In vivo functional relationships among terminal proteins of Bacillus subtilis phi29-related phage. *Gene* 148, 107–112.

[141] Donate, L. E., Valpuesta, J. M., Rocher, A., Mendez, E., Rojo, F., Salas, M., and Carrascosa, J. L. (1992) Role of the amino-terminal domain of bacteriophage phi 29 connector in DNA binding and packaging. *J. Biol. Chem.* 267, 10, 919–10, 924.

[142] Franklin, J. (1992) A DNA packaging protein of phage T4, the product of gene 17, binds cooperatively to single-strand ed DNA. PhD thesis, Vand erbilt University, Nashville, TN.

[143] Higgins, R. R., Lucko, H. J., and Becker, A. (1988) Mechanism of *cos* DNA cleavage by bacteriophage lambda terminase-multiple roles of ATP. *Cell* 54, 765–775.

[144] Parris, W., Davidson, A., Keeler, C. L., Jr., and Gold, M. (1988) The Nu1 subunit of bacteriophage λ terminase. *J. Biol. Chem.* 263, 8413–8419.

[145] Kimura, M. and Fujisawa, H. (1991) Dissection of the functional domains of the packaging protein of bacteriophage T3 by site-directed mutagenesis. *Virology* 180, 709–715.

[146] Eppler, K., Wyckoff, E., Goates, J., Parr, R., and Casjens, S. (1991) Nucleotide sequence of the bacteriophage P22 genes required for DNA packaging. *Virology* 183, 519–538.

[147] Grimes, S. and Anderson, D. (1990) RNA dependence of the bacteriophage phi29 DNA packaging ATPase. *Mol. Biol.* 215, 559–566.

[148] Ibarra, B., Valpuesta, J. M., and Carrascosa, J. L. (2001) Purification and functional characterization of p16, the ATPase of the bacteriophage phi29 packaging machinery. *Nucleic Acids Res.* 29(21), 4264–4273.

[149] Hoeprich, S. and Guo, P. (2002) Computer modeling of three-dimensional structure of DNA-packaging RNA(pRNA) monomer, dimer, and hexamer of phi29 DNA packaging motor. *J. Biol. Chem.* 277(23), 20, 794–20, 803.

[150] Garver, K. and Guo, P. (1997) Boundary of pRNA functional domains and mini-mum pRNA sequence requirement for specific connector binding and DNA packaging of phage phi29. *RNA* 3, 1068–1079.

[151] Chen, C. and Guo, P. (1997) Magnesium-induced conformational change of packaging RNA for procapsid recognition and binding during phage phi29 DNA encapsidation. *J. Virol.* 71, 495–500.

[152] Bailey, S., Wichitwechkarn, J., Johnson, D., Reilly, B., And erson, D., and Bodley, J. W. (1990) Phylogenetic analysis and secondary structure of the *Bacil- lus subtilis* bacteriophage RNA required for DNA packaging. *J. Biol. Chem.* 265, 22, 365–22, 370.

[153] Chen, C., Zhang, C., and Guo, P. (1999) Sequence requirement for hand-in-hand interaction in formation of pRNA dimers and hexamers to gear phi29 DNA translocation motor. *RNA* 5, 805–818.

[154] Reid, R. J. D., Bodley, J. W., and And erson, D. (1994) Characterization of the prohead-pRNA interaction of

bacteriophage φ29. *J. Biol. Chem.* 269, 5157–5162.

[155] Chen, C., Sheng, S., Shao, Z., and Guo, P. (2000) A dimer as a building block in assembling RNA: a hexamer that gears bacterial virus phi29 DNA-translocating machinery. *J. Biol. Chem.* 275(23), 17, 510–17, 516.

[156] Reid, R.J.D., Zhang, F., Benson, S., and Anderson, D. (1994) Probing the structure of bacteriophage φ29 prohead RNA with specific mutations. *J. Biol. Chem.* 269, 18, 656–18, 661.

[157] Zhang, C. L., Lee, C.-S., and Guo, P. (1994) The proximate 5' and 3' ends of the 120-base viral RNA (pRNA) are crucial for the packaging of bacteriophage φ29 DNA. *Virology* 201, 77–85.

[158] Zhang, C. L., Tellinghuisen, T., and Guo, P. (1995) Conformation of the helical structure of the 5'/3' termini of the essential DNA packaging pRNA of phage φ29. *RNA* 1, 1041–1050.

[159] Wichitwechkarn, J., Johnson, D., and And erson, D. (1992) Mutant prohead RNAs in vitro packaging of bacteriophage phi29 DNA-gp3. *Mol. Biol.* 223, 991–998.

[160] Zhang, C. L., Tellinghuisen, T., and Guo, P. (1997) Use of circular permutation to assess six bulges and four loops of DNA-packaging pRNA of bacteriophage φ29. *RNA* 3, 315–322.

[161] Zhang, C. L., Garver, K., and Guo, P. (1995) Inhibition of phage φ29 assembly by antisense oligonucleotides targeting viral pRNA essential for DNA packag- ing. *Virology* 211, 568–576.

[162] Trottier, M., Garver, K., Zhang, C., and Guo, P. (1997) DNA-packaging pRNA as target for complete inhibition of viral assembly in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 36, 187–189.

[163] Trottier, M. and Guo, P. (1997) Approaches to determine stoichiometry of viral assembly components. *J. Virol.* 71, 487–494.

[164] Trottier, M., Zhang, C. L., and Guo, P. (1996) Complete inhibition of virion assembly *in vivo* with mutant pRNA essential for phage φ29 DNA packaging. *J. Virol.* 70, 55–61.

[165] Trottier, M., Mat-Arip, Y., Zhang, C., Chen, C., Sheng, S., Shao, Z., and Guo, P. (2000) Probing the structure of monomers and dimers of the bacterial virus phi29 hexamer RNA complex by chemical modification. *RNA* 6, 1257–1266.

[166] Guo, P., Zhang, C., Chen, C., Trottier, M., and Garver, K. (1998) Inter-RNA interaction of phage phi29 pRNA to form a hexameric complex for viral DNA transportation. *Mol. Cell.* 2, 149–155.

[167] Zhang, F., Lemieux, S., Wu, X., St.-Arnaud, S., McMurray, C. T., Major, F., and And erson, D. (1998) Function of hexameric RNA in packaging of bacteriophage phi29 DNA in vitro. *Mol. Cell.* 2, 141–147.

[168] Wichitwechkarn, J., Bailey, S., Bodley, J. W., and Anderson, D. (1989) Prohead RNA of bacteriophage φ29: size, stoichiometry and biological activity. *Nucleic Acids Res.* 17(9), 3459–3468.

[169] Chen, C., Trottier, M., and Guo, P. (1997) New approaches to stoichiometry determination and mechanism investigation on RNA involved in intermediate reactions. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 36, 190–193.

[170] Shu, D., Huang, L., and Guo, P. (2003) A simple mathematical formula for stoichiometry quantitation of viral and nanobiological assemblage using slopes of log/log plot curves. *J. Virol Methods* 115(1), 19–30.

[171] Guo, P. (2002) Structure and function of phi29 hexameric RNA that drive viral DNA packaging motor: review. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 72, 415–472.

[172] Peterson, C., Simon, M., Hodges, J., Mertens, P., Higgins, L., Egelman, E., and Anderson, D. (2001) Composition and mass of the bacteriophage phi29 prohead and virion. *J. Struct. Biol.* 135, 18–25.

[173] And erson, D. L., Hickman, H. H., and Reilly, B. E. (1966) Structure of *Bacillus subtilis* bacteriophage φ29 and the length of φ29 deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 91, 2081–2089.

[174] Carrascosa, J. L., Mendez, E., Corral, J., Rubio, V., Ramirez, G., Salas, M., and Vinuela, E. (1981) Structural organization of *Bacillus subtilis* phage φ29: a model. *Virology* 111, 401–413.

[175] Villanueva, N. and Salas, M. (1981) Adsorption of bacteriophage phi 29 to *Bacillus subtilis* through the neck appendage of the viral particle. *J. Virol.* 38(1), 15–19.

[176] Villanueva, N., Lazaro, J. M., and Salas, M. (1981) Purification, properties and assembly of the neck-appendage protein of the *Bacillus subtilis* phage phi 29. *Eur. J. Biochem.* 117, 499–505.

[177] Hohn, T., Wurtz, M., and Hohn, B. (1976) Capsidtrans for mation during packaging of bacteriophage λ DNA. *Philos.*

Trans. R. Soc. Lond. Ser. B 276, 51–61.

[178] Davidson, A. and Gold, M. (1987) Anovel *in vitro* DNA packaging system demonstrating a direct role for the bacteriophage λ FI gene product. *Virology* 161, 305–314.

[179] Gold, M. and Becker, A. (1983) The bacteriophage λ terminase: partial purification and preliminary characterization of properties. *J. Biol. Chem.* 258, 14, 619– 14, 625.

[180] Becker, A., Murialdo, H., Lucko, H., and Morell, J. (1988) Bacterio phagelambda DNA packaging: the product of the F1 gene promotes the incorporation of the prohead to the DNA-terminase complex. *J. Mol. Biol.* 199, 597–607.

[181] White, J. H. and Richardson, C. C. (1987) Gene 18 protein of bacteriophage T7. Overproduction, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* 262, 8845–8850.

[182] Guo, P. (2002) Methods for structural and functional analysis of an RNA hexamer of bacterial virus phi29 DNA packaging motor. *Acta Biochim. Biophys. Sinca* 34(5), 533–543.

[183] Zhang, C.L., Trottier, M., and Guo, P.X. (1995) Circularly permuted viral pRNA active and specific in the packaging of bacteriophage φ29 DNA. *Virology* 207, 442–451.

[184] Wu, T., Ruan, K., and Liu, W. (1996) A fluorescence-labeling method for sequencing small RNA on polyacrylamide gel. *Nucleic Acids Res.* 24, 3472, 3473.

[185] Babcock, M. S., Pednault, E. P. D., and Olson, W. K. (1994) Nucleic acid structure analysis: mathematics for local cartesian and helical structure parameters that are truly comparable between structures. *J. Mol. Biol.* 237, 125–156.

[186] Gautheret, D. and Cedergren, R. (1993) Modeling the three-dimensional structure of RNA. *FASEB J.* 7, 97–105.

[187] Jimenez, J., Santisteban, A., Carazo, J. M., and Carrascosa, J. L. (1986) Computer graphic display method for visualizing three-dimensional biological struc- tures. *Science* 232, 1113–1115.

[188] Carazo, J. M., Donate, L. E., Herranz, L., Secilla, J. P., and Carrascosa, J. L. (1986) Three-dimensional reconstruction of the connector of bacteriophage φ29 at 1.8 nm resolution. *J. Mol. Biol.* 192, 853–867.

[189] Smith, D. E., Tans, S. J., Smith, S. B., Grimes, S., And erson, D. L., and Bustamante, C. (2001) The bacteriophage phi29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature* 413, 748–752.

[190] Hendrix, R. W. (1998) Bacteriophage DNA packaging: RNA gears in a DNA ransport machine [minireview]. *Cell* 94, 147–150.

[191] Dubé, P., Tavares, P., Lurz, R., and van Heel, M. (1993) The portal protein of bacteriophage SPP1: a DNA pump with 13-fold symmetry. *EMBO J.* 12, 1303–1309.

[192] Turnquist, S., Simon, M., Egelman, E., and And erson, D. (1992) Supercoiled DNA wraps around the bacteriophage φ29 head-tail connector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10,479–10,483.

[193] Astumian, R. D. (1997) Thermodynamics and kinetics of a Brownian motor. *Science* 276, 917–922.

[194] Leibler, S. (1994) Brownian motion: moving forward noisily. *Nature* 370, 412, 413.

[195] Soong, R. K., Bachand , G. D., Neves, H. P., Olkhovets, A. G., Craighead, H. G., and Montemagno, C. D. (2000) Powering an inorganic nanodevice with a biomolecular motor. *Science* 290, 1555–1558.

[196] Baneyx, G. and Vogel, V. (1999) Self-assembly of fibronectin into fibrillar networks underneath dipalmitoyl phosphatidylcholine monolayers: role of lipid matrix and tensile forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 12, 518–12, 523.

[197] Hess, H. and Vogel, V. (2001) Molecular shuttles based on motor proteins: active transport in synthetic environments. *Rev. Mol. Biotechnol.* 82, 67–85.

[198] Niemeyer, C. M. (2002) The developments of semisynthetic DNA-protein conjugates. *Trends Biotechnol.* 20, 395–401.

[199] Schmidt, O. G. and Eberl, K. (2001) Nanotechnology: thin solid films roll up into nanotubes. *Nature* 410, 168.

[200] Modi, A., Koratkar, N., Lass, E., Wei, B., and Ajayan, P. M. (2003) Miniaturized gas ionization sensors using carbon nanotubes. *Nature* 424, 171–174.

[201] Credo, G. M., Boal, A. K., Das, K., Galow, T. H., Rotello, V. M., Feldheim, D. L., and Gorman, C. B. (2002) Supramolecular assembly on surfaces: manipulating conductance in noncovalently modified mesoscale structures. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 9036–9037.

[202] Baneyx, G., Baugh, L., and Vogel, V. (2002) Supramolecular chemistry and self-assembly special feature: fibronectin extension and unfolding within cell matrix fibrils controlled by cytoskeletal tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 5139– 5143.

[203] Hyman, P., Valluzzi, R., and Goldberg, E. (2002) Design of protein struts for self-assembling nanoconstructs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 8488–8493.

[204] Goldberger, J., He, R., Zhang, Y., Lee, S., Yan, H., Choi, H. J., and Yang, P. (2003) Single-crystal gallium nitride nanotubes. *Nature* 422, 599–602.

[205] Davenport, R. J. (2001) Crossover research yield scents and sensitivity—watching a virus get stuffed. *Science* 291, 2071–2072.

[206] Hoeprich, S., Zhou, Q., Guo, S., Shu, D., Qi, G., Wang, Y., and Guo, P. (2003) Bacterial virus phi29 pRNA as a hammerhead ribozyme escort to destroy hepa- titis B virus. *Gene Ther.* 10(15), 1258–1267.

[207] Shu, D., Huang, L., Hoeprich, S., and Guo, P. (2003) Construction of phi29 DNA-packaging RNA (pRNA) Monomers, dimers and trimers with variable sizes and shapes as potential parts for nano-devices. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 4, 295–302.

[208] Mat-Arip, Y., Garver, K., Chen, C., Sheng, S., Shao, Z., and Guo, P. (2001) Three-dimensional interaction of phi29 pRNA dimer probed by chemical modification interference, cryo-AFM, and cross-linking. *J. Biol. Chem.* 276, 32, 575– 32, 584.

[209] Tuerk, G. and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505–510.

[210] Ellington, A. D. and Szostak, J. W. (1990) *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligand s. *Nature* 346, 818–822.

[211] Ciesiolka, J., Gorskl, J., and Yarus, M. (1995) Selection of an RNA domain that binds Zn^{++}. *RNA* 1, 538–550.

[212] Klug, S. J. and Famulok, M. (1994) All you wanted to know about SELEX. *Mol. Biol. Rep.* 20, 97–107.

[213] Wang, C., Jin, Y. X., and Wang, D. B. (1998) Selection with SELEX method of small RNA molecules specifically binding to starch. Sheng Wu Hua Xue. Yu Sheng Wu Wu Li Xue. *Bao. (Shanghai)* 30, 402–404.

[214] Shtatland , T., Gill, S. C., Javornik, B. E., Johansson, H. E., Singer, B. S., Uhlenbeck, O. C., Zichi, D. A., and Gold, L. (2000) Interactions of Escherichia coli RNA with bacteriophage MS2 coat protein: genomic SELEX. *Nucleic Acids Res.* 28, E93.

[215] Deamer, D. W. and Akeson, M. (2000) Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing. *Trends Biotechnol.* 18, 147–151.

[216] Sundquist, W. I. and Heaphy, S. (1993) Evidence for interstand quadruplex formation in the dimerization of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3393–3397.

[217] Skripkin, E., Paillart, J. C., Marquet, R., Ehresmann, B., and Ehresmann, C. (1994) Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4945– 4949.

[218] Paillart, J. C., Skripkin, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C., and Marquet, R. (1996) A loop-loop “kissing” complex is the essential part of the dimer linkage of genomic HIV-1 RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5572–5577.

[219] Ferrand on, D., Koch, I., Westhof, E., and Nusslein-Volhard, C. (1997) RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAUFEN ribonucleoprotein particles. *EMBO J.* 16, 1751–1758.

[220] Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., and Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35, 849–857.

[221] Oh, B. K. and Pace, N. R. (1994) Interaction of the 3'-end of tRNA with ribonu- clease P RNA. *Nucleic Acids Res.* 22(20), 4087–4094.

[222] Baer, M. F., Reilly, R. M., McCorkle, G. M., Hai, T. Y., Altman, S., and Raj Bhand ary, U. L. (1988) The recognition by RNase P of precursor tRNAs. *J. Biol. Chem.* 263, 2344–2351.

[223] Eguchi, Y. and Tomizawa, J. (1990) Complex formed by complementary RNA stem-loops and its stabilization by a protein: function of ColE1 Rom protein. *Cell* 60, 199–209.

[224] Panuska, J. R. and Goldthwait, D. A. (1980) A DNA dependent ATPase from T4-infected *E. coli*: purification and

properties of a 63, 000-dalton enzyme and its conversion to a 22, 000-dalton form. *J. Biol. Chem.* 255, 5208–5214.

[225] Guo, P. and Trottier, M. (1994) Biological and biochemical properties of the small viral RNA (pRNA) essential for the packaging of the double-strand ed DNA of phage φ29. *Semin. Virol.* 5, 27–37.

[226] Serwer, P. (1988) The source of energy for bacteriophage DNA packaging: an osmotic pump explains the data. *Biopolymers* 27, 165–169.

[227] Ellison, V. and Stillman, B. (2001) Opening of the clamp: an intimate view of an ATP-driven biological machine. *Cell* 106, 655–660.

[228] Hingorani, M. M. and O'Donnell, M. (2000) Sliding clamps: a (tail)ored fit. *Curr. Biol.* 10, 25–29.

[229] Kainov, D. E., Pirttimaa, M., Tuma, R., Butcher, S. J., Thomas, G. J., Jr., Bamford, D. H., and Makeyev, E. V. (2003) RNA packaging device of double-strand ed RNA bacteriophages, possibly as simple as hexamer of P4 protein. *J. Biol. Chem.* 278, 48, 084–48, 091.

[230] Lisal, J., Kainov, D. E., Bamford, D. H., George, J. T., and Tuma, R. (2003) Enzymatic mechanism of RNA translocation in dsRNA bacteriophages. *J. Biol. Chem.* 279, 1343–1350.

[231] West, S. C. (1996) DNA helicases: new breeds of translocating motors and molecular pumps. *Cell* 86, 177–180.

[232] Niedenzu, T., Roleke, D., Bains, G., Scherzinger, E., and Saenger, W. (2001) Crystal structure of the hexameric replicative helicase RepA of plasmid RSF1010. *J. Mol. Biol.* 306, 479–487.

[233] Gogol, E. P., Seifried, S. E., and von Hippel, P. H. (1991) Structure and assembly of the Escherichia coli transcription termination factor rho and its interaction with RNA. I. Cryoelectron microscopic studies. *J. Mol. Biol.* 221, 1127–1138.

[234] Burgess, B. R. and Richardson, J. P. (2001) RNA passes through the hole of the protein hexamer in the complex with the Escherichia coli Rho factor. *J. Biol. Chem.* 276, 4182–4189.

[235] Bowers, J., Tran, P. T., Joshi, A., Liskay, R. M., and Alani, E. (2001) MSH-MLH complexes formed at a DNA mismatch are disrupted by the PCNA sliding clamp. *J. Mol. Biol.* 306, 957–968.

[236] Sedman, J. and Stenlund, A. (1998) The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J. Virol.* 72, 6893–6897.

[237] Leu, F. P. and O'Donnell, M. (2001) Interplay of a clamp loader subunits in opening the β sliding clamp of E. coli DNA polymerase III holoenzyme. *J. Biol. Chem.* 276, 47, 185–47, 194.

[238] Song, M. S., Dallmann, H. G., and McHenry, C. S. (2001) Carboxyl-terminal domain III of the delta subunit of the DNA polymerase III holoenzyme binds delta. *J. Biol. Chem.* 276, 40, 668–40, 679.

[239] Geiduschek, E. P. (1997) Riding the (mono)rails: the structure of catenated DNA-tracking proteins. *Chem. Biol.* 2, 123–125.

[240] Young, M. C., Schultz, D. E., Ring, D., and von Hippel, P. H. (1994) Kinetic parameters of the translocation of bacteriophage T4 gene 41 protein helicase on single-strand ed DNA. *J. Mol. Biol.* 235, 1447–1458.

[241] Herendeen, D. R., Kassavetis, G. A., and Geiduschek, E. P. (1992) A transcrip-tional enhancer whose function imposes a requirement that proteins track along DNA. *Science* 256, 1298–1303.

[242] Geiselmann, J., Wang, Y., Seifried, S. E., and von Hippel, P. H. (1993) A physical model for the translocation and helicase activities of Escherichia coli tran- scription termination protein rho. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7754–7758.

[243] Davis, L. I. (1995) The nuclear pore complex. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 865–896.

[244] Krug, R. M. (1993) The regulation of export of mRNA from nucleus to cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 944–949.

[245] Pfeifer, K., Weiler, B. E., Ugarkovic, D., Bachmann, M., Schroder, H. C., and Muller, W. E. (1991) Evidence for a direct interaction of Rev protein with nuclear envelope mRNA-translocation system. *Eur. J. Biochem.* 199, 53–64.

[246] Young, M., Kuhl, S., and von Hippel, P. (1994) Kinetic theory of ATP-driven translocases on one-dimensional polymer lattices. *J. Mol. Biol.* 235, 1436–1446.

[247] Egelman, E. H. (1996) Homomorphous hexameric helicases: tales from the ring cycle. *Structure* 4, 759–762.

[248] San Martin, M. C., Gruss, C., and Carazo, J. M. (1997) Six molecules of SV40 large T antigen assemble in a propeller-shaped particle around a channel. *J. Mol. Biol.* 268, 15–20.

[249] Huang, L. P. and Guo, P. (2003) Use of PEG to acquire highly soluble DNA-packaging enzyme gp16 of bacterial virus phi29 for stoichiometry quantification. *J. Virol. Methods* 109, 235–244.

[250] Peterson, C., Simon, M., Hodges, J., Mertens, P., Higgens, L., Egelman, E., and And erson, D. (2001) Composition and Mass of the Bacteriophage phi29 Prohead and Virion. *J. Struct. Biol.* 135, 18–25.

第 14 章　有序蛋白质阵列结构

Jarrod Clark, Taras Shevchuk, Piotr M. Swiderski,
Rajesh Dabur, Laura E. Crocitto, Yaroslav I. Buryanov, Steven S. Smith

概　　述

人工有序蛋白质阵列为解决各种生物学和纳米科学问题提供了简便的方法。当前示范系统，用核酸链型或转甲基酶融合，以便靶蛋白或靶肽对核酸支架有意义。这些示范指向大量有用的设备和使用这种方法可以想象的装配，包括智能生物探针和药物递送系统。从原理上来讲，这些系统现在能够模拟生命起源以前生物的最早形式，并可预期，在不久的将来达到模拟小病毒的复杂性。第三代甲基转移酶抑制剂，提供了使用这种方法构造智能化疗剂的一个实例。在评估最终组装和这种类型的实验设计中，我们介绍了酶学机制、计算机辅助设计和基于毛细管电泳的微流体芯片的用途。

关键词：生物纳米技术；DNA 甲基转移；蛋白质顺序；蛋白质靶；DNA 支架；抑制剂设计；抑制剂递送；智能化疗；大分子监狱（分子容器）；微流体

14.1　导　　论

生物纳米技术是生物技术和纳米技术交叉的一个新兴领域。像其他的纳米技术一样，其目标是生产有用的材料和设备。该领域很多技术是仿生的，也就是说它试图模仿生物程序。迄今为止该领域所采用的许多方法，以天然产物化学大分子形式，瞄准核酸和蛋白质生产高分子机器。本章讲述了生物传感器[1]、二维晶体[2]、电子电路[3]和燃料振荡器[4]。

该技术现在能够模拟生命起源前的分子进化。根据目前的思路，生命起源前，生物的最早形式可能产生了超分子聚集体，称为代谢团块[5]，最终发生了翻译[6]。翻译出现之前，我们认为 RNA 世界是一个不断发展的系统，其中 RNA 扮演的只是结构和催化的作用。代谢团块被看作组装体，即根据核酸骨架不同功能指令，执行核酸碱基配对规则进行装配。核酸支架短区域和 RNA 功能化适配器短区域之间的碱基配对，被认为已经产生了适当的功能化比对[5]。Niemeyer 等[7,8]应用这种方法，已经成功地开发了有序超分子组装的生物纳米技术。

在最初实验中，他们使用生物素化 DNA，作为适配器命令耐热蛋白链霉亲和素沿着

DNA 螺旋[8]的螺旋轴进行排序。由于链霉亲和素与生物素非常紧密结合的先天能力，链霉亲和素蛋白与 DNA 的末端结合。然后 DNA 或 RNA 分子被用作支架隔离和匹配连接链霉亲和素分子[8]，特别像代谢团块起初想象的一样[5]。当 DNA 被用作组织分子时，链霉亲和素部分期望围绕 DNA 分子（36°/bp）的螺纹轴排列；然而，当使用 RNA 时，这种起源被想象成与 RNA·DNA 杂合体（30°/bp）的螺纹轴相一致。

链霉亲和素聚集也提供了二次装配的机会。例如，通过生物素添加到 2 个互补寡核苷酸的 5′端，2 个、3 个或 4 个生物素与每个链霉亲和素残基接触连接，就已经可能形成 DNA 环结构或网络[7]。此外，链霉亲和素分子与每个蛋白质部分以 4 个生物素残基的化学计量结合生物素。这就是 DNA-链霉亲和素结合物上的三叶状空闲位点。这些空闲位点将生物素化抗体附着到连接链霉亲和素的 DNA 上[8]。这就允许阵列的碱基配对互补，使 DNA 微结构化表面阵列衍生，从而转化成不同的抗原特异性的蛋白质阵列[8]。

生物素化的蛋白质可以与抗生物素蛋白连接，然后靶向 DNA 或 RNA 组织分子，提供它们能够承受长期暴露在高于 50℃环境下所需的退火过程。另外，通过在低温下保温，链霉亲和素分子拴在 DNA 或 RNA 上，生物素化蛋白就被隔离而不考虑沿组织 DNA 或 RNA 分子排序。用这些方法，在此系统中对蛋白质的邻近效应也进行了研究。在这种方法的一个例子中，将 NADPH 氧化还原酶与萤光素酶邻接，以便改善这些酶正常耦合的系统光发射的特性。已观察到重大改善[9]。综上所述，由 Niemeyer 等研究的连接适配器技术，已经产生了几个有趣和潜在的，对含有有序蛋白质阵列有用的纳米级组件。

我们开发了一种可供选择的、构建有序蛋白质阵列的方法。核酸互补允许代谢团块演化为翻译之后，这种方法类似于生命起源以前进化后期。翻译的出现允许生命起源之前的系统产生肽和蛋白质，它们对超分子聚集有了更多灵活性。认为由核酸和蛋白质之间的序列特异性相互作用所提供的灵活性，已经允许这些超分子聚集体移动，经过 RNA 世界进入现代分子生物学世界，形成生命状态通用基础。基于蛋白质-核酸相互作用构建有序蛋白质阵列，我们开发了生物纳米技术[10,11]。该技术的当前状态提示，它将允许产生可编程设备的结构，具有复杂程度等同于生命起源前最先进的代谢团块和假定小病毒。

14.2　三地址阵列有序组装

三地址阵列有序组装的基本原则是，DNA 转甲基酶与在图 14.1 反应图中描述的 DNA 有共价连接的能力。该属性加上其他定义核酸序列的选择性，使得 DNA 转甲基酶，充当融合蛋白定向 DNA 支架特定位点的靶向剂[11]。在下文中，Y 形结重组中间产物，充当一种用这种技术排序蛋白质的方法学例子。

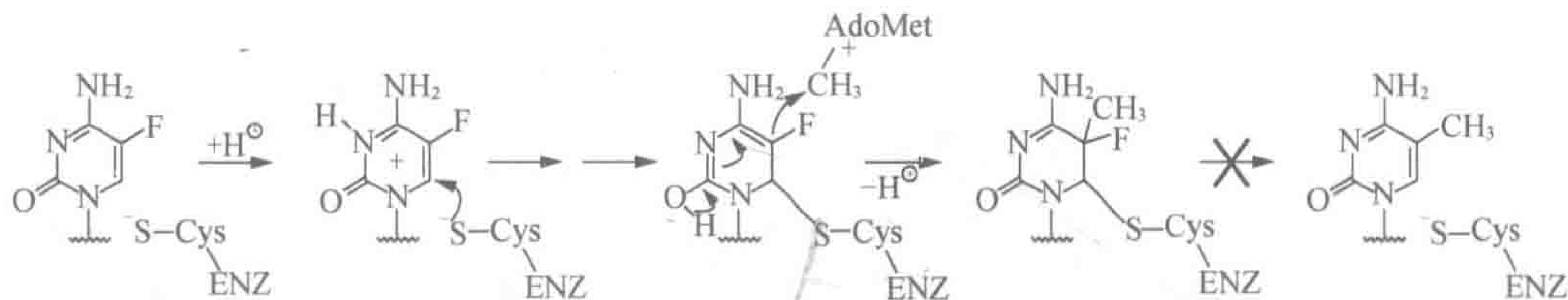


图 14.1　DNA 转甲基酶机制。转甲基酶在胞嘧啶或 5-氟胞嘧啶的 C6 上进行亲核攻击。这打破了环中 5-6 双键和激活 C5 的甲基转移。甲基从 S 腺苷-[L]-蛋氨酸（AdoMet）转移至胞嘧啶的 C5 后，C5 上的氢和 C6 上酶的亲核试剂均由β消除反应除去。当氟存在于 C5 时，由于氟-碳键的力量这种现象不可能出现。因此，该反应的进程被阻止，使酶和通过酶靶向胞嘧啶环之间的共价键断开。在 M•*Eco*RⅡ的情况下，它是在 CCWGG 识别序列中第二个胞嘧啶被攻击，其中 W 代表 A 或 T。M•*Hha*Ⅰ攻击在 GCGC 序列中的第一个胞嘧啶，和人类 Dnmt1（hDnmt1）攻击在 CG 二核苷酸中的胞嘧啶

14.2.1　分子模型

虽然并不总是可能的或绝对必要的，但至少正在考虑制备初级分子组装模型的大多数情况下，我们发现它非常有效。在这种情况下（图 14.2），用生物分子模拟软件 InsightⅡ（Accelrys 公司，圣地亚哥，加利福尼亚州）构建了 Y 形结重组中间体的分子模型。DNA 构建者将从有 PDB ID:1MTH 蛋白质数据库[13]获得的 M·*Hha*Ⅰ蛋白质-DNA 复合物的三维结构中的 DNA 进行了扩展（M·*Hha*Ⅰ为转甲基化酶，译者注）[12]。在中心处连接的臂形成 Y 形结的模型具有精确序列。用能量细化分子力场建立的辅助模型[14]，使结构最小化，从而约束在交叉点中心臂旁 10bp 中的 DNA 和蛋白质结构。

相对于分子力学所得结构的能量被最小化，达到平均力差异(RMS)力小于 0.1kcal/ (mol·Å)。根据分子力学，用 1000 步频简单动力学使每个结构进一步最小化。由于 M•*Eco*RⅡ晶体结构不可用，我们并没有试图制备原子核定位信号（NLS）-M•*Eco*RⅡ融合蛋白的分子模型。对这种蛋白质[15]的当前信息表明，在 Y 形结上的 30bp 臂，可容纳 M•*Hha*Ⅰ蛋白质与 Y 形结的相邻臂连接所创建的环境中的融合蛋白。

14.2.2　寡核苷酸制备

加入 5-氟脱氧胞苷作为 TMP-F-dU-CE 可转换亚磷酰胺。所有其他碱基以标准亚磷酰胺化学加入。在 260nm 吸收光谱测浓度。通过在 10mmol/L 的 Tris-HCl（pH 7.2），1mmol/L 的 EDTA 和 100mmol/L NaCl 中混合等摩尔量寡核苷酸，形成双链和 Y 形结，得到终浓度为 6μmol/L。95℃退火反应 5min，50℃ 60min，室温 10min，然后置于冰上 10min。在本项研究中所使用的 Y 形结寡核苷酸序列如下：

```
                     M                                    F
1. 5′-GCTGGCTATGCCACCAGGTGAGGCTAACTGAGGTAGCACGAGCGCGCTACAATCTGGTGA-3′
                     M                                   F
2. 5′-TCACCAGATTGTAGCGCGGTCGTGCTACCTGGTTCCACCAGATGCGCGTGACCTGTAGTT-3′
                     M                                  F
3. 5′-AACTACAGGTCACGCGCATCTGGTGGAACCCAGTTAGCCTCACCTGGTGGCATAGCCAGC-3′
```

其中，M 表示胞嘧啶 5-甲基，F 表示 5-氟部分。

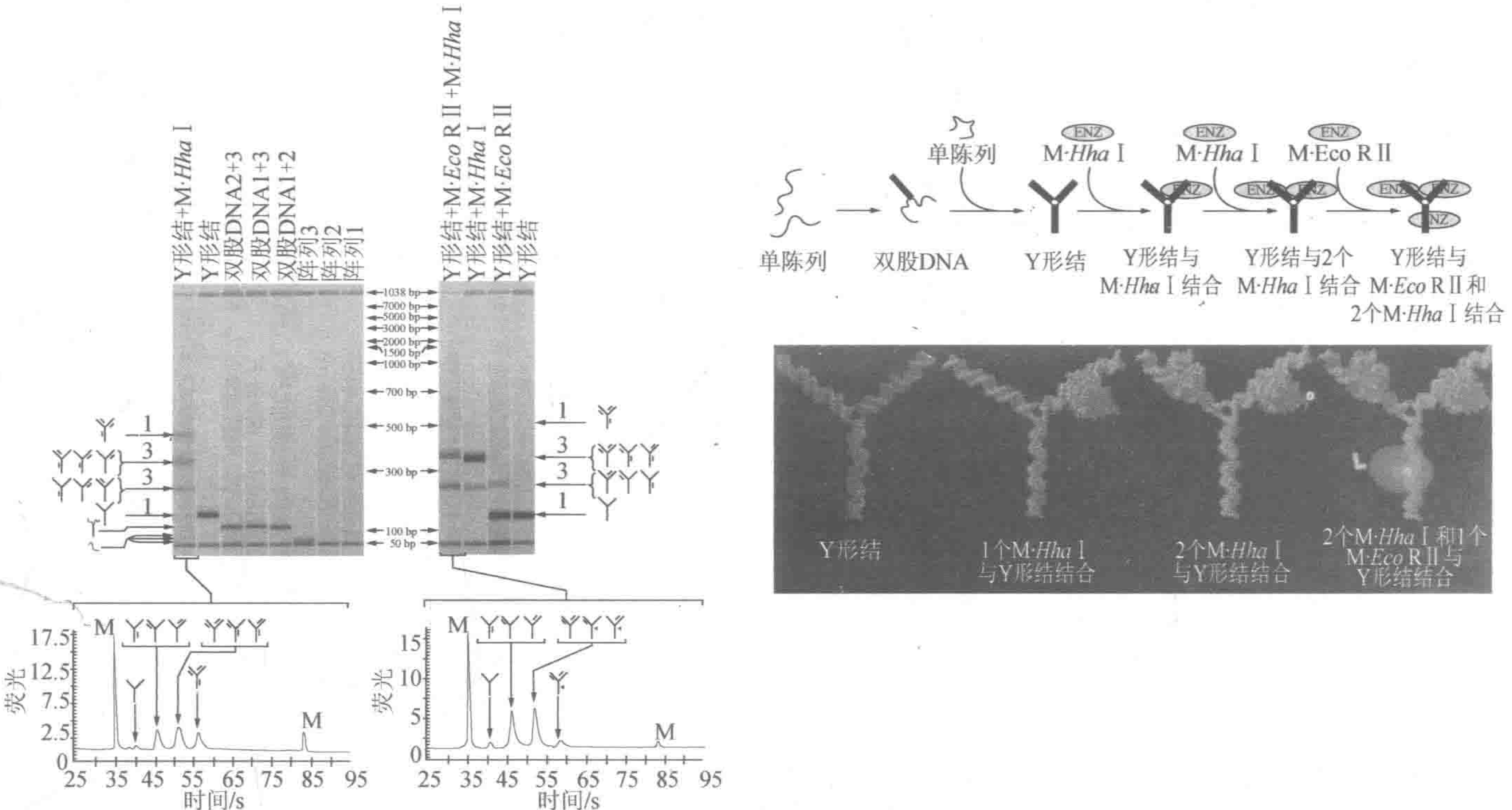


图 14.2　三地址核蛋白质阵列的装配。右上角为机器最后组装过程示意图。右下角黑色面板显示三地址阵列的组装中预测的中间体的分子模型一旦双工 Y 形结本身就形成了。在分子模型板的最后一帧，NLS-M•*Eco*R II 被描绘为与歪附属物描绘的 NLS 肽的卵形。使用一种新开发的微流体芯片的方法进行核蛋白复合物迁移率检测[20]。该方法采用生物分析仪系统（安捷伦，帕洛阿尔托，加利福尼亚州）和 LabChip® 微流体芯片（钳技术，山景，CA）对核酸检测和表征[56,57]。分析中使用 DNA 7500，即用于 DNA 双链的在 15～7500bp 的分离芯片设计。三个单链的每一个按它们预期长度迁移。由每两股的组合形成的开口双链体迁移具有的表观流动性，相当于约 110bp.的双链体标记。当所有三股链退火时 Y 形结容易形成（在 DNA 芯片 500 虚拟凝胶面板最右边泳道）。它的移动对应于在 7500 芯片 150bp 的双链体。Y 形结与融合蛋白结合显示出对应于该 270bp 的双链体的流动性。当 M•*Hha* I 被引入反应，观察到三个地址 M•*Hha* I 存在预期的集合中间体（最左边的泳道中 DNA 芯片虚拟凝胶面板）和插页流动扫描描绘，左下）。此外，当一个地址 M•*Hha* I 和两个地址 NLS-M•*Eco*R II 和两个地址存在于结点时，观察到一组不同的中间形式（右泳道 DNA 芯片虚拟凝胶板和插块的移动性扫描图，右图下）

14.2.3　微流控芯片监控 Y 形结组装

在过去，我们使用聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）监测 DNA 的支架组装[11,16]；然而，这种方法费时，且在一般情况下，还要求使用 ^{32}P 端标记。最近，我们使用微流体芯片系统进行分析，因为它非常迅速，要求样品量可忽略不计，并且不需要使用放射性标记 DNA。

DNA 500 实验芯片或该 DNA 7500 实验芯片，可用于相位差产品的检测。9μl 凝胶染料混合物加入到适当的孔中，芯片通入 0.8ml 空气 30s。当采用 DNA 500 实验芯片时，将 5μl 的凝胶染料混合物加入到每个孔中，并将 1μl 500 芯片标准物加入到梯井。使用 DNA7500 实验芯片时，5μl 的内部标记物混合物和 1μl 的 7500 芯片标准加到井中。9μl 凝胶染料混合，然后加入到每两个凝胶储井。从每个反应中取出 1μl 加到 1/12 样品井。接着将该芯片 2400r/min 涡旋震荡 1min。最后，将芯片置于 Agilent 2100 生物分析仪中处理 5min。

Y 形结的组装步骤示意图显示在图 14.2（右上面板前三个步骤）。这种类型分析的代表性结果也示于图 14.2（最左边的虚拟凝胶，泳道 1～7 从右到左）。

14.2.4　NLS-M•*Eco*RⅡ融合蛋白的克隆与表达

使用重组 DNA 技术的融合蛋白构建和表达是本技术的一个重要组成部分。每个融合蛋白是不同的，并且需要量身定做的靶向转甲基酶的性质和靶向融合蛋白的方法。融合蛋白的表达接下来至少是部分纯化。NLS-M•*Eco*RⅡ融合蛋白的克隆，表达和纯化是一个简单例子。

含有 M•*Eco*RⅡ-NLS 融合蛋白的质粒 pRT103，通过在 pRT103 多功能克隆位点中的 *Nco* Ⅰ 位点插入 NLS 基因盒而构建。M•*Eco*RⅡ全长序列，是从 pBR322 的克隆中分离的，并连接到在 pRT103 多用途克隆位点的 *Bam*HⅠ位点[17]。这导致了 M•*Eco*RⅡ的 N 端的 NLS 序列阅读框架，在植物 35S CaMV 启动子控制之下，在大肠杆菌中有效促进转录。哺乳动物核定位信号位于副本 5′端。CaMV 启动细菌翻译终止信号，位于 3′至 *Bam*HⅠ位点中。将质粒转染到大肠杆菌 GM2163（新英格兰生物实验室），在 35S 启动子的控制下连续表达。在 Luria 培养基中细菌有氧生长直到他们达到静止状态为止。

虽然使用限制性内切酶切割和连接，形成这个特定的融合蛋白，但我们还发现既方便又有效的是使用聚合酶链反应（PCR）来扩增融合蛋白和靶向甲基转移酶。使用高保真聚合酶非常有效，以及 PCR 技术的使用在限定引物中可以加入到任何所希望的限制性位点，从而有利于融合蛋白产生的质粒系统组装。

14.2.4.1　纯化

融合蛋白的纯化基本上如先前所述[18,19]。将细胞溶解于含有 50mmol/L 的 Tris-HCl（pH7.8）、10%（*V*/*V*）甘油、1mmol/L EDTA 和 750μg/ml 溶菌酶（Sigma 公司，圣路易

斯，MO）的缓冲液中。0℃ 30min 后，将混合物 20℃温育 5min。黏性混合物脉冲超声波处理 15s，用 Branson 超声仪（布兰森，丹伯里，CT）以微尖最大设置脉冲程序，在 0℃冷却 1min。超声处理过程中的温度保持低于 15℃。5000*g* 离心 10min 除去细胞碎片。随后上清液与等体积 DEAE 琼脂糖（Pharmacia 公司，乌普萨拉，瑞典）混合，混合前 DEAE 琼脂糖用含有 50mmol/L 的 Tris-HCl（pH7.8）、10%（*V*/*V*）甘油、1mmol/L EDTA 和 150 mmol/L 氯化钠进行平衡。搅拌 30min 后，过滤收集未结合的物质。

然后将滤液与 0.5 倍体积回收的磷酸纤维素混合（P-11；Whatman 公司，梅德斯通，英国）。搅拌 30min 后，将混合物过滤，P-11 滤饼再悬浮于 2 倍体积含有 150mmol/L NaCl 的相同缓冲液中。将滤饼再次用过滤法收集，并再悬浮于 2 倍体积含有 400mmol/L 氯化钠的相同缓冲液中。再过滤洗脱，收集过滤后的流体（约 170mg 蛋白质），对 150mmol/L NaCl 洗脱缓冲液透析。将透析的材料加入到两个串联连接的 5ml Cibacron-blue Econo-Pak 快速蛋白质液相层析（FPLC）柱（Bio-Rad 公司，赫拉克勒斯，CA）柱中。用 50ml 含 180mmol/L 盐的相同缓冲液洗涤。用增加盐浓度到 1.5mol/L 的 NaCl 的相同缓冲液洗脱。使用 Waters Millennium 32 系统（沃特斯，米尔福德，MA）检测制备梯度和蛋白质。然后用 Centricon-10 浓缩器（Amicon，富康，MA）浓缩活性组分。M·*Hha* Ⅰ不同于用 PAGE 需要同质制备样品，M•*Eco*RⅡ-NLS 融合蛋白在聚丙烯酰胺凝胶上用考马斯蓝 R250（Sigma）染色，大约有 15 条可见条带，这表明可见蛋白质高达约 20%。用先前描述的方法纯化 M·*Hha* Ⅰ[11]。

14.2.4.2　蛋白质偶联条件

Y 形结退火的浓度为 0.37～1.5μmol/L，暴露于 M·*Hha* Ⅰ浓度范围，0.81～2.43μmol/L 的含 50mmol/L 的 Tris-HCl（pH 7.8），10mmol/L EDTA、5mmol/L 的β-巯基乙醇，和 80μmol/L 的 AdoMet 结合缓冲液。反应的最终体积为 10μl。然后将反应物在 37℃下温育 2.5h。

14.2.5　基于微流控芯片蛋白质迁移率监测最终装配

电泳迁移率分析（EMSA）是一种充分表征和广泛使用的蛋白质-DNA 相互作用和转录因子组合学分析技术。如目前实施的一样，EMSA 一般包括使用放射性标记的 DNA 和聚丙烯酰胺凝胶电泳。我们已经注意到[20]，该技术是微流体芯片设计分离 DNA 片段的有效工具。要做到这一点，将样品放在 DNA 500 实验芯片或根据制造商的说明放入 DNA 7500 实验芯片（卡尺技术）中，然后在 2100 生物分析仪（安捷伦）中分析。图 14.2（右虚拟凝胶板）是双面 Y 形结与 NLS-M•*Eco*RⅡ融合蛋白和 M•*Hha* Ⅰ的混合物混合获得的最终装配的结果。当 M•*Hha* Ⅰ位于 Y 形结的每个臂上时，预期观察到的中间体（Y 形结+M•*Hha* Ⅰ1；图 14.2 中左虚拟凝胶和嵌入面板扫描）。

14.3　有序阵列智能药物设计的应用

DNA 转甲基酶抑制剂设计进展如图 14.3 所示。在这里，我们看到的小分子，必须掺入 DNA 作为第一代此类抑制剂。单链构象（SSC）显示，转甲基酶识别动机和靶向酶抑制目标是第二代抑制剂。用有序的蛋白质阵列的生物纳米技术研究第三和第四代抑制剂如 14.3.4 节和 14.3.5 节所介绍的。

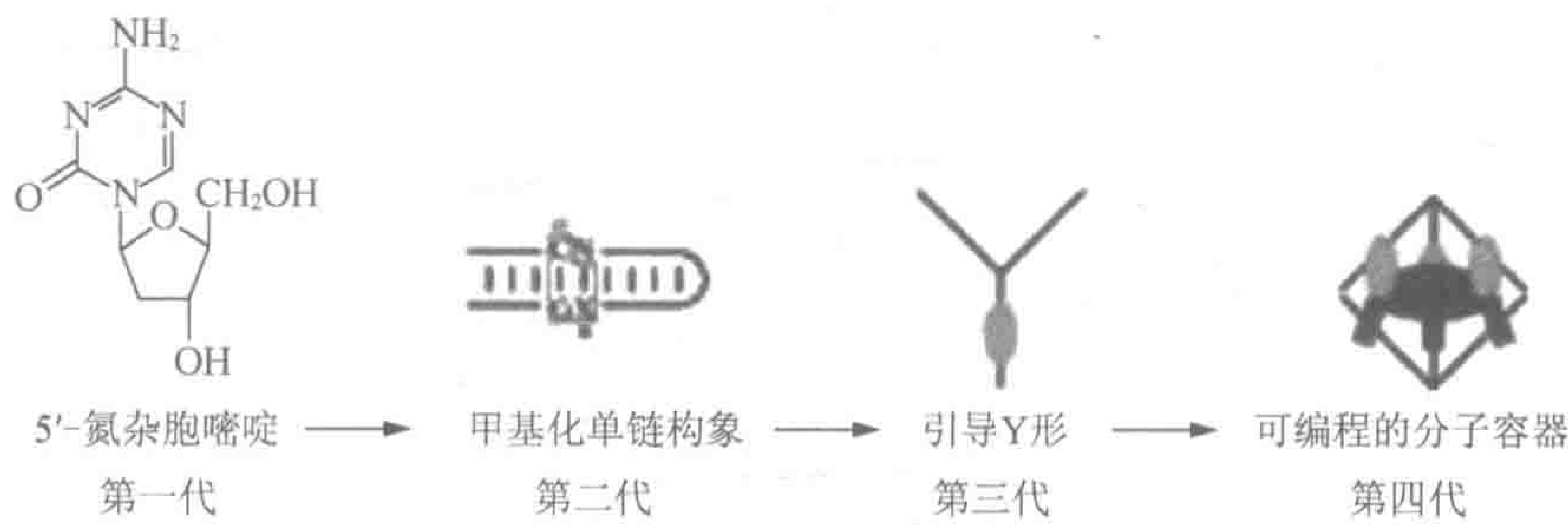


图 14.3　设计进程示意图。第一代抑制剂是小分子拥有成为 DNA 和陷阱转甲基酶的能力。第二代抑制剂是携带一个转甲基酶陷阱单链构象（SSC）。图中三核苷酸识别 L-形盒标记的 hDnmt 1 的主要特征。第三代抑制剂与连接于甲基陷阱的甲基活化剂结合位点重组中间体。它们通过连接蛋白质与核定位信号引导至细胞核。第四代抑制剂是自组装和可编程半分子容器，它能感测环境和（或）暴露包封或保护在期望的细胞或细胞内的位置的实体

14.3.1　DNA 甲基转移酶抑制肿瘤生物学

虽然我们刚刚开始全面了解，在正常细胞中选择性基因的激活和抑制的复杂性，这些过程呈现，将补充的染色质重塑因子靶向与发育调控蛋白质-蛋白质偶联，蛋白质与 DNA 的相互作用组合学调节，导致启动子激活或抑制。基因沉默的组织特异性模式一旦建立，蛋白质和 DNA 修饰自我强化网络似乎就能稳定地保持，这些修饰包括组蛋白甲基化、组蛋白低度乙酰化和胞嘧啶甲基化[21]。在感知对照基因沉默中不出现这些修饰，即在正常分化过程中不启动基因沉默。然而，它们显然是由改变甲基化和脱乙酰基酶[22~26]的活性和特异性的辅因子与核酸结构改变，建立的哺乳动物沉默基因的重要标志。

有趣的是，肿瘤发生时基因表达模式产生随机选择的结果，来自不可逆的遗传损伤，以及在肿瘤进程中的自然选择复杂的相互作用。除了伴随改变与该过程相关联的基因组结构外，克隆证实基因表达模式的改变，将导致异位基因表达和异位基因沉默。

鉴于能够持续扩增的肿瘤细胞克隆子，在肿瘤发生中获得了一定程度适应局部环境的能力，合理的建议认为，要批量破坏它们已经克隆建立的基因表达模式，至少要减缓它们扩散。这种概念已经导致探索中断这些异染色质化稳态模式的方法。如预期的那样，组蛋白乙酰酶抑制剂和 DNA（胞嘧啶-5）转甲基酶抑制剂[27,28]对颠覆异基因中自我强化修饰网络的协同作用，允许沉默基因非特异性激活。然而，无论是组蛋白脱乙酰酶还是 DNA（胞嘧啶-5）转甲基酶的抑制，通常都有充足再活化能力。其中，关注最多的是 DNA

甲基转移酶抑制剂作为潜在的化疗药物（见参考文献[29]～[31]）。

14.3.2 第一代抑制剂

至少有初步人体试验的抑制剂，作为当前物质支持包括一系列的掺入 DNA 可溶性小分子[29~32]。

如同对细胞的机器最一般的攻击一样，该方法的有效关键参数是，靶肿瘤内在的灵敏度、抑制药物的生物分布和避免潜在的副作用[29~32]。在唯一潜在的副作用中，这种方法真正潜力是不期望活性物的释放，如来自基因沉默的多重耐药性[33]。

目前虽然患者样品非常少，但是对 DNA 转甲基酶抑制剂，脱氧胞嘧啶（2'脱氧-5-氮杂胞苷）有显著响应是在急性白血病中。已报道多达 33%的患者中完全响应，是用于治疗复发的慢性骨髓性白血病，而 20%～30%是复发性急性骨髓性白血病[34]。实体瘤的响应已经不太频繁，但 DNA 甲基转移酶的抑制剂，5,6-二氢-5-氮杂胞苷，在黑素瘤中的最高响应达到 5%[35]。

虽然广泛报道了前列腺癌，在细胞系和临床标本中的甲基化异常，但用甲基转移酶抑制剂进行临床研究还非常有限。尽管如此，地西他滨（一种 DNA 甲基化的有效抑制剂）能诱导 PC3 和 DU145 细胞系分化[36]。此外，在有限的患者研究中，已经报道地西他滨的耐受性良好，并在 2～12 例转移性 D2 前列腺癌[36]中得到了稳定的响应。

14.3.3 第二代抑制剂

上述第一代产品甲基转移酶抑制剂，只有化疗价值或者有联合化疗作用显然为时过早[29,31]。即便如此，转甲基化酶抑制剂仍然是探索中的两个新方向。 第一代 DNA 转甲基酶抑制剂[32]和第二代甲基转移酶抑制剂都正在研究中[37~41]。第二代抑制剂地西他滨的功能应通过随机掺入 DNA 避免产生副作用，因为第二代产品的抑制剂是 DNA 类似物充当甲基转移酶的直接抑制剂[38,40,42,43]。

虽然第二代抑制剂不用于有序蛋白质阵列或生物纳米技术本身，但如 14.3.4 节所述，它们是第三代抑制剂的潜在元件。因此，对于评价设计性能是有价值的。

14.3.3.1 靶电子结构活性关系确定和 DNA 甲基转移酶抑制剂的设计

用电子结构活性关系（ESAR）已成功地预测了细菌酶上抑制剂 FdC[11]、dU[44]和 2-嘧啶酮[45]的作用效果。因此，这似乎是测定对转甲基酶功能候选抑制剂作用的常规用途。一种分析候选靶算法显示于图 14.4。用一系列已知的计算法和转甲基酶可能的抑制剂图如图 14.5 所示。鉴于人 DNA（胞嘧啶-5）转甲基酶通常称为 Dnmt1 的已知参数，该数据表明候选的第二代酶的抑制剂应具有以下特征。

1）它们一般应出现双链区（即可能包含错配），即由在单链形成的发夹中 28pb 双链体[46,47]或从两个完全互补或部分互补的寡核苷酸形成的双链体[48]。

2）局部双链应包含非生产性[44]或弱生产力三核苷酸基序[38,48]。如在所引用的参考文献所定义的一样，三核苷酸识别基序由胞嘧啶或在一条链上优选与鸟嘌呤配对的 5-甲基胞嘧啶，或一个 3′靶碱基的肌苷残基组成。总之，这是靶碱基基序定义。如图 14.3 所示（第二代）。

3）这些非生产性基序靶向酶到非生产性或碱基修饰的核苷酸，其中前线轨道的能量差的基准绝对值（图 14.4），根据提供的数据，用于亲核攻击是大于 0.737 97eV，或转甲基大于 7.392 87eV [43]。

参考文献[38]、[41]、[46]和[49]中介绍的发夹分子达到这些标准，即具备第 3 点中甲基转移非常需要核苷酸类似物正常配对的前线轨道能量差。

14.3.3.2　多重错误定位碱基

生产底物（$^{dC}S_1$）和多错误定位非生产性底物（$^{NdC}S_2$）饱和曲线如图 14.5 所示。序列如下：

1）$^{dC}S_1$：CG-甲基化寡核苷酸靶向正常配对 dC。

```
                                          m
oligo CG－甲基化  5′ GTC－CAC－CAG－ATC－CGG－GCT－ACC－TGG－CCT －CGA 3′
oligo 无甲基化    3′ GAG－GTG－GTC－TAG－GCC－CGA－TGG－ACC－GGA－GCT 5′
                                            *
```

2）$^{NdC}S_2$:非−CG-甲基化寡核苷酸正常配对 dC、dT、dA 和 dG。

```
                           m  m m  m       m  m      m     mm        mm   m
oligo 非－CG－甲基化  5′ GTC－CAC－CAG－ATC－CGG－GCT－ACC－TGG－CCT －CGA 3′
oligo 无甲基化        3′ CAG－GTG－GTC－TAG－GCC－CGA－TGG－ACC－GGA－GCT 5′
                            XX   XX         X*      X    X  X     XX    *
```

其中 X 表示错误定位碱基，*表示一个适当的靶碱基，m 表示靶向甲基。

底物 $^{dC}S_1$ 先前的工作[50,51]表明，掺入氚几乎完全定义甲基靶向胞嘧啶（*），氚掺入底物 $^{NdC}S_2$ 很可能被定向到底物或其他胞嘧啶残基的寡脱氧核苷酸中 2 个生产性位点。基于电子结构活性关系，10～12 靶位点，会产生酶的非生产性结合位点，定位于分子最低空余轨道（LUMO）超过亲核攻击所需能量的 dT、dG 或 dA。人类酶具有 28bp[48]范围内的占位面积，表明这种类型脱氧寡核苷酸以 10/12（0.833）的概率与非生产性位点结合，一般仅会结合一次。因此，观察到底物的低 *Vm* 和低 *Km* 有力地提示，与底物相互作用的堆积是非生产性靶向 dA、dG 和 dT 位点。清一色甲基化也提高了寡核苷酸的 *Tm* 值为 74～80℃，表明这种酶还可以与甲基化靶部位结合，但被破坏碱基堆积相互作用所需要的额外能量减慢而碱基弹出螺旋。

A

用甲基模拟DNA糖制备分子模型

嘧啶类似物？

是 → 如果可能的话制备N_3原子化形式 → 优化的几何形状（SYBYL分子机制）

否 → 优化的几何形状（SYBYL分子机制）

优化几何形状（三级微扰理论半实证）

优化几何形状（从计算机中的Hartree-Fock方法）取6-31G*基组

计算机前线轨道能

[1]计算ΔE_{HL}=|ref HOMO−LUMO| $|\Delta E_{HL}|>0.73797eV$?

是 → 关闭酶的亲核攻击

否 → 嘧啶类似物制备 1-甲基-6-甲硫基-胞苷-2

优化几何形状（SYBYL分子机制）

优化几何形状（PM3半实证）

优化几何形状（从头计算中的Hartree-Fock方法）取6-31G*基组

计算前线轨道能

[2]计算ΔE_{LH}=|ref LUMO−HOMO| $|\Delta E_{LH}|>7.39287eV$?

是 → 酶减缓或关闭甲基转移

否 → 酶将转移甲基到目的部位

1　$H_3C-N(H)-C(=O)-C(H)(NH-CH_3)-CH_2-S^{\ominus}$

分子前线轨道能参考N3，N5二甲基半胱氨酸巯基阴离子

2　$H_3C-CH_2-CH_2-S^{\oplus}(CH_3)-CH_3$

丙基二甲基硫阳离子

图 14.4　ESAR 第二代甲基转移酶抑制剂。（A）ESAR 算法决定是亲核攻击还是甲基转移会受到抑制作用的影响。（B）前线轨道图像比较靶模型，允许亲核攻击以胞嘧啶模型（受体攻击）与不允许亲核攻击（受体不攻击）的靶模型化合：（Ⅰ）1-甲基-5-嘧啶酮阳离子（N3 质子）；（Ⅱ）1-甲基-5-氟胞嘧啶阳离子（N3 质子）；（Ⅲ）1-甲基-5-氮杂胞嘧啶阳离子（N3 质子）；（Ⅳ）1-甲基胞嘧啶阳离子（N3 质子）；（Ⅴ）1-甲基-4-硫尿嘧啶；（Ⅵ）1-甲基-3-溴尿嘧啶；（Ⅶ）1-甲基-2-嘧啶酮；（Ⅷ）1-甲基-5-氟尿嘧啶；（Ⅸ）1-甲基脲嘧啶；（Ⅹ）1-甲基假尿嘧啶（ψ）；（Ⅺ）1-甲基胸腺嘧啶；（Ⅻ）1-甲基-5-氮杂胞嘧啶；（XⅢ）-1-甲基胞嘧啶；（XⅣ）的 9-甲基-8-羟基鸟嘌呤；（XⅤ）9 甲基腺嘌呤；（XⅥ）9 甲基鸟嘌呤；（XⅦ）9-甲基-7-脱氮鸟嘌呤；（XⅫ）N3，N5 二甲基半胱氨酸硫醇阴离子

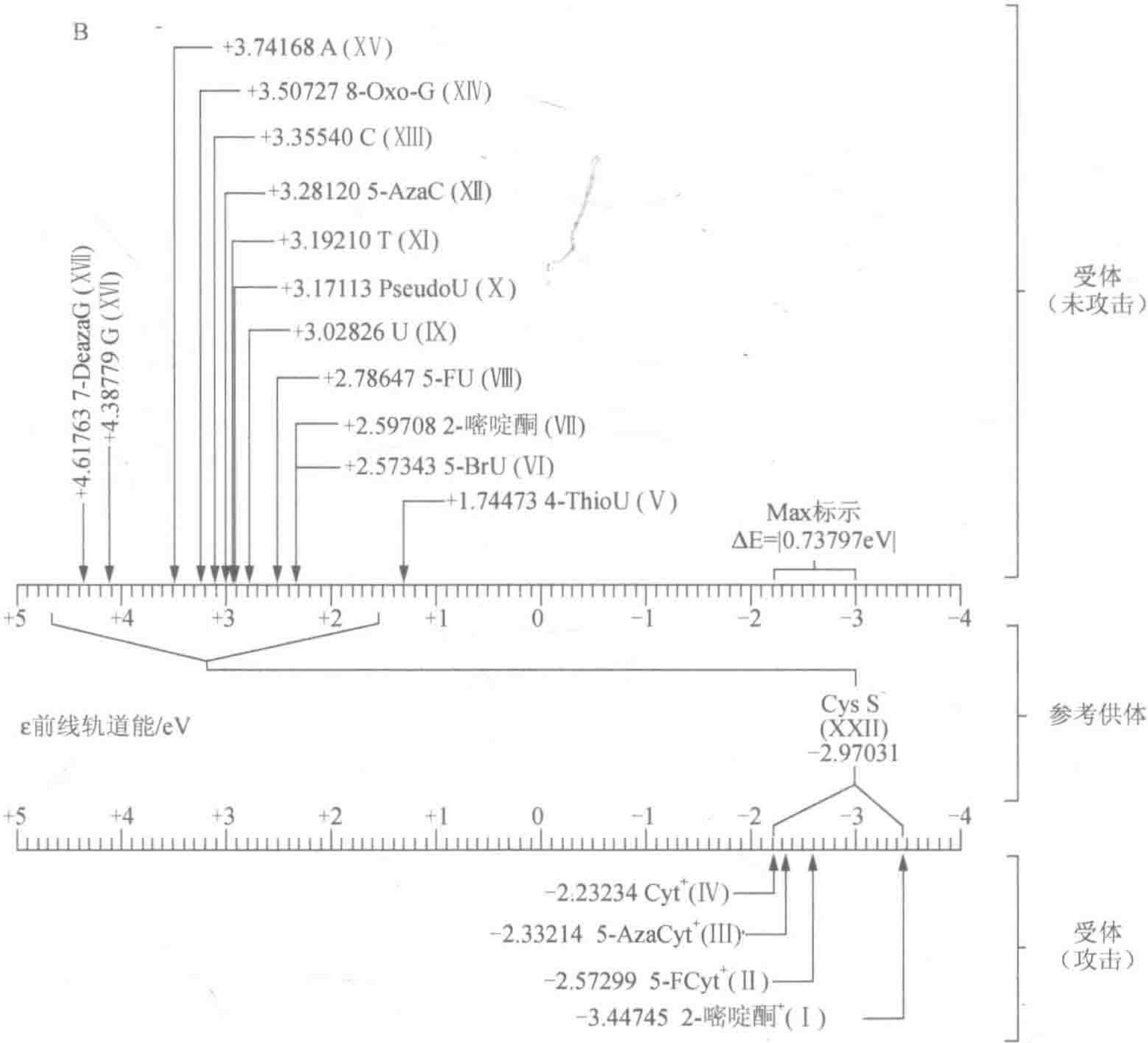


图 14.4 （续）

鉴于监测氚掺入任一底物的动力学，图 14.5A 中左边对动力学反应路线进行了说明。描述该反应[52]的一般公式如下：

$$v=(Vm_1[S_1]/Km_1+Vm_2[S_2]/Km_2)/(1+[S_1]/Km_1+[S_2]/Km_2) \qquad (14.1)$$

$$Km_2=Km_1[S_2](v-Vm_2)/(Vm_1[S_1]-v([S_1]+Km_1)) \qquad (14.2)$$

14.3.3.3 单个错误定位碱基

尽管转甲基酶反应涉及 AdoMet 和 DNA 为底物，以恒定的 AdoMet 的浓度，DNA 饱和动力学是高生产力底物或弱生产力底物的双曲线。当生产性底物以恒定浓度存在时和弱生产底物加入不同量时，根据两个 DNA 底物系统动力学预测，被弱生产性底物所抑制。在许多情况下，掺入到弱生产性竞争底物是非常低的。这使得它很难直接从饱和状态评估 Km_2。在这些情况下，我们发现到达 Vm_2 上限并确定来自式（14.2）的 Km_2 的平均值非常有用。

一般来说，我们已经注意到，基于互相比较，多位点错误定位第二代抑制剂比单个错误定位抑制剂更有效。多位点错误定位抑制剂 $^{NdC}S_2$ 的抑制曲线如图 14.5B 所示。

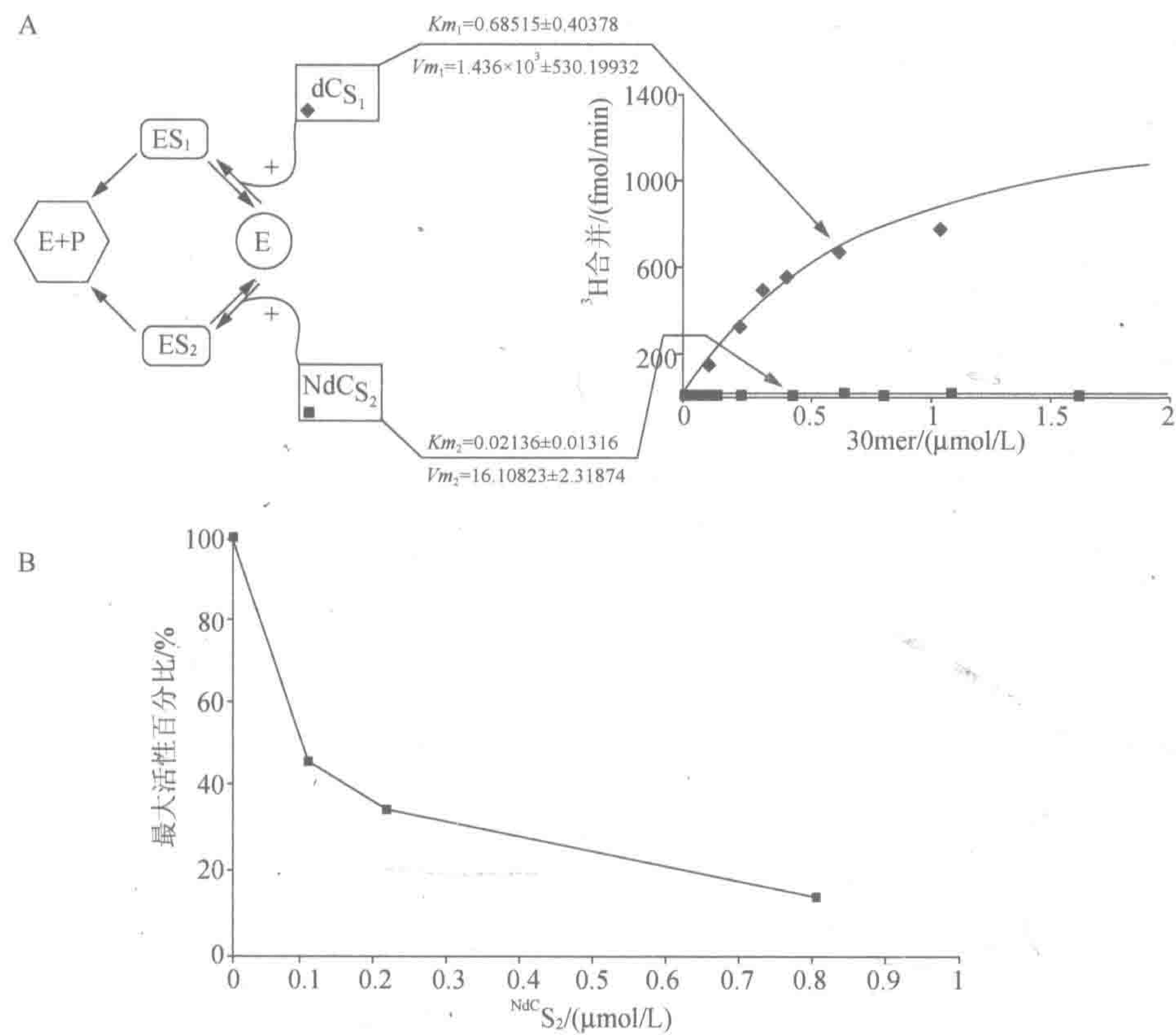


图 14.5　基于核酸的抑制剂作用。(A) 半甲基化 DNA 和非 CG 甲基化 DNA 的饱和曲线。尽管底物只有一条链以胞嘧啶携带甲基基团，半甲基化底物($^{dC}S_1$)靶向 hDnmt1 到单个胞嘧啶残基。第二底物($^{NdC}S_2$)错靶向酶到 dG、dA 和 dT 残基。基于右侧的两底物反应方案，($^{dC}S_1$) 以恒定浓度增加 ($^{NdC}S_2$) 浓度预期抑制酶。(B) 通过单独和多错误靶向底物类似物对人 DNA 转甲基酶的抑制作用。活性底物 ($^{dC}S_1$) 将来自 AdoMet 的 ^{3}H 甲基基团快速掺入到 DNA（规范化至 100%的活性)。这种持续的反应被增加第二底物 $^{NdC}S_2$ 的量所抑制

14.3.4　第三代抑制剂

正在研究第三代抑制剂形式之一，像在第二代抑制剂中发现的那些情况一样，包含具有连接到转甲基酶陷阱的甲基活化剂结合位点重组中间体。由蛋白质与核定位信号连接将这些抑制剂引导到细胞核，如图 14.6 所示。这样的抑制剂设计参数如图 14.7 所示。为了构建这种机器，将 NLS-M•*Eco*RII 融合蛋白克隆并如 14.2.4 节中描述的那样，将融合蛋白进行纯化。通过生物分析仪 2100 和 DNA 微流体芯片分析迁移率监控最终组装。如图 14.2 所示，在最终装配过程中的每个步骤，可以用微流体分析预期的中间体进行监测。该数据清楚地表明，定向转甲基酶核蛋白装配，可用于产生基于生物纳米技术设计的，抑制人类 DNA 转甲基酶的机器（参见图 14.2 中 Y 形结-M•*Eco*RII 泳道)。现在正在设计测试 hDnmt1 的体外和体内抑制效果。

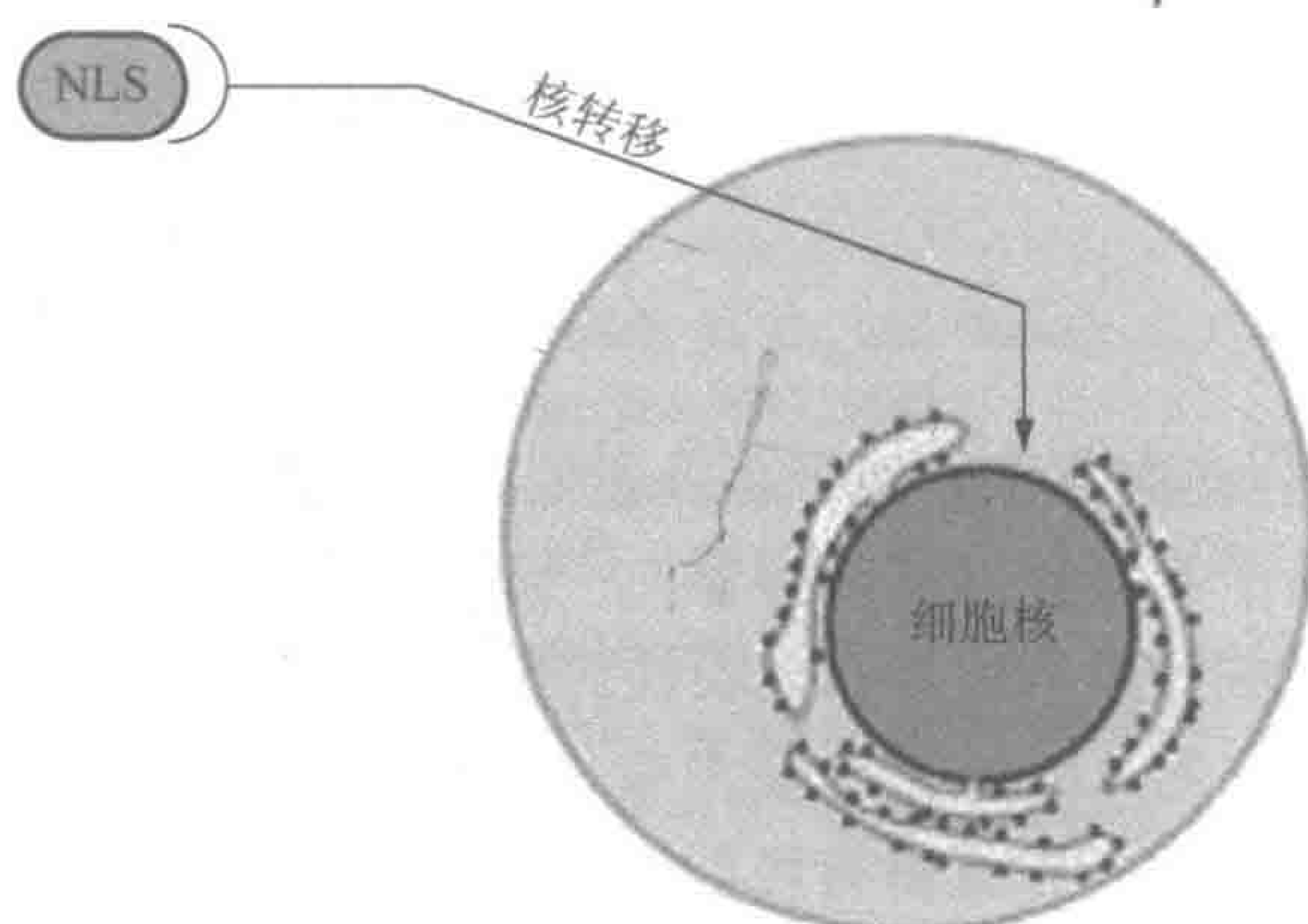


图 14.6　核定位序列 NLS 导向蛋白到细胞核的示意图

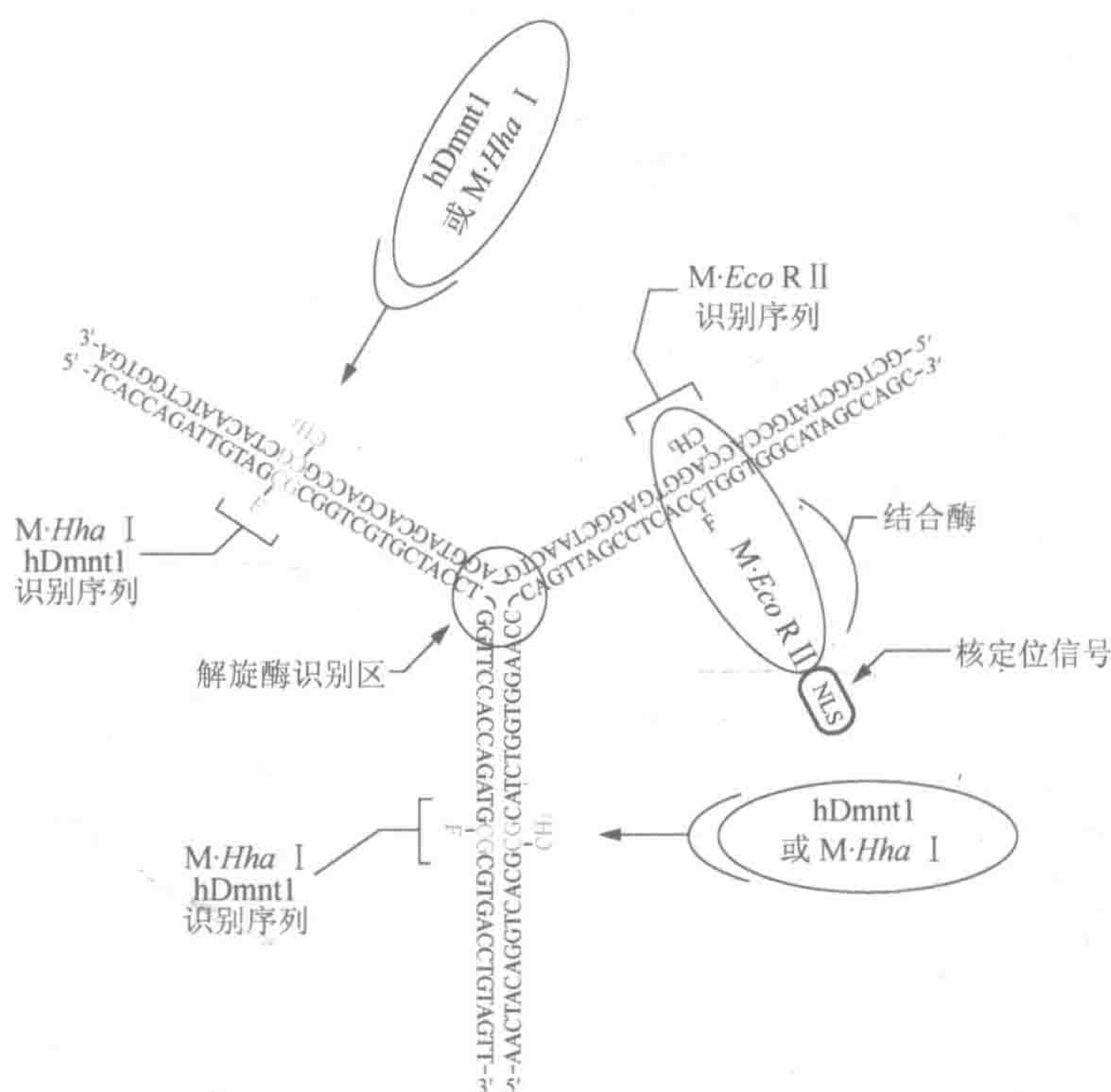


图 14.7　人类 DNA 转甲基酶：制导 Y 形结抑制作用的生物纳米机制。该机器包括一个 Y 形结蛋白质阵列支架可充当一个重组中间体，从而进一步激活已经激活的转甲基酶靶向位点（hDnmt1 识别序列）。这个设备还具有吸引解旋酶（解旋酶识别区域）的潜力。Y 形结的臂携带人类的识别序列每个为 30bp 长。因此，它们各自为 hDnmt1 在抑制剂的每个双重捕获区域呈现足够的动能足迹。整个系统由一个诱捕细菌转甲基酶（M•*Eco*RⅡ）承载被设计成将机器与细胞核运输系统链接 NLS，以便有效地将其放置在有大部分 hDnmt1 作用的细胞核中

基于阵列的蛋白质信号或结合位点进行更加精密的设计是完全可能的。但是，这种类型的设计，将需要四臂或 X 形结以容纳排列功能。这些设计的详细讨论超出了本章的

范围。

14.3.5 第四代抑制剂

Warmuth 和 Yoon[53]首次研究类似于小分子监狱（或分子容器）的第四代抑制剂。这些自组装和可编程大分子半监狱（或半容器）[54]将能够感知环境和识别或脱壳包被或隐藏实体于希望的细胞或细胞内的位置。代表性的设计如图 14.8 所示。有序蛋白质阵列在这种类型的设计的价值，对 DNA 结合蛋白或只有在小分子配体存在下释放有用。这种类型的许多蛋白质是已知的，并且将有可能对期望的配位体做出工程响应，配位体局部存在的高浓度，导致半分子监狱解体。分解可用于释放大分子结构或暴露内表面，以便攻击或修饰定位于高浓度配体区域中某些细胞系统。

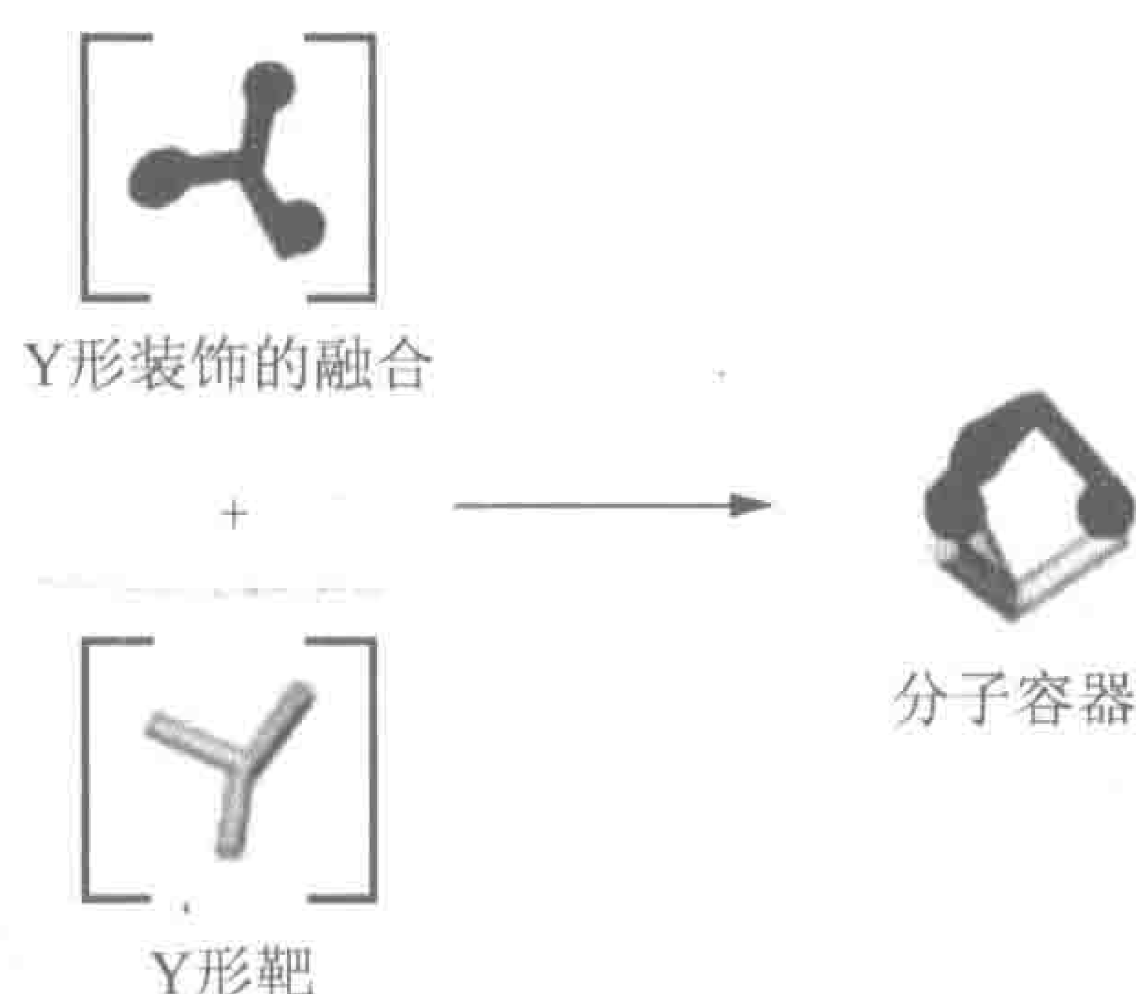


图 14.8　自组装三角形双棱锥体大分子监狱。转甲基酶靶向 DNA 结合蛋白用于装饰的 Y 形结以便将融合蛋白位于 Y 形结每个臂螺旋的同一面上。靶向 Y 形结包含每个臂的 DNA 结合蛋白结合位点。混合这两种组分应导致拥有三角形双棱锥体（约翰逊固体）边缘拓扑学的封闭结构。所得内腔可用于容纳大分子，或者隐藏抑制性核酸的表面。如果配体敏感 DNA 结合蛋白用来作为所选择的融合蛋白，以产生一个半分子监狱将发生结构（未显示）的分解。取决于融合子的选择，半分子监狱将在低配体或高配体浓度区域内分解，因为 DNA 结合或通过融合释放会通过改变配体浓度来诱导

14.4 结　　论

有序蛋白质阵列为解决生物学和纳米科学中各种问题提供了简便的途径。目前示范系统使用核酸链接[55]或与蛋白质靶向核酸支架中的转甲基酶融合[54]。这些系统现在能够模仿生命起源前生物体最早的形式，并且可以预期在不久的将来可做出复杂的小病毒。在评估这些设计的最后组装中，微流体芯片的应用为它们的构建和测试提供了方便[20]。可以设想，组装数量是相当大的，并将酶对延伸[9]到这里描述的智能化疗剂。因此，人们可以预料，不久的将来，大量有趣的和复杂的基于阵列的组件和设备都将出现在我们面前。

参考文献

[1] Yun, C. S., Khitrov, G. A., Vergona, D. E., Reich, N. O., and Strouse, G. F. (2002) Enzymatic manipulation of DNA-nanomaterial constructs. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 7644, 7645.

[2] Seeman, N. C. (1991) Construction of three-dimensional stick figures from branched DNA. *DNA Cell. Biol.* 10, 475–486.

[3] Gil, A., de Pablo, P. J., Colchero, J., Gómez-Herrero, J., and Baró, A. M. (2002) Electrostatic scanning force microscopy images of long molecules: single-walled carbon nanotubes and DNA. *Nanotechnology* 13, 309–313.

[4] Yurke, B., Turberfield, A. J., Mills, A. P. Jr., Simmel, F. C., and Neumann, J. L. (2000) A DNA-fuelled molecular machine made of DNA. *Nature* 406, 605–608.

[5] Gibson, T. J. and Lamond, A. I. (1990) Metabolic complexity in the RNA world and implications for the origin of protein synthesis. *J. Mol. Evol.* 30, 7–15.

[6] Woese, C. R. (2002) On the evolution of cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 8742–8747.

[7] Niemeyer, C. M., Adler, M., Gao, S., and Chi, L. (2000) Supramolecular nanocircles consisting of streptavidin and DNA. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39, 3055–3059.

[8] Niemeyer, C. M., Sano, T., Smith, C. L., and Cantor, C. R. (1994) Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semisynthetic DNA—streptavidin hybrid molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and the con- struction of supramolecular bioconjugates. *Nucleic Acids Res.* 22, 5530–5539.

[9] Niemeyer, C. M., Koehler, J., and Wuerdemann, C. (2002) DNA-directed assembly of bienzymic complexes from in vivo biotinylated NAD(P)H:FMN oxi- doreductase and luciferase. *Chembiochem.* 3, 242–245.

[10] Smith, S. S. (1995) Nucleoprotein-based nanoscale fabrication. *Biol.Biomed.Sci. Technol. Div.* Office of Naval Research (ONR) 34196-3, 161, 162.

[11] Smith, S. S., Niu, L., Baker, D. J., Wendel, J. A., Kane, S. E., and Joy, D. S. (1997) Nucleoprotein-based nanoscale assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2162–2167.

[12] Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R. J., and Cheng, X. (1994) HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell* 76, 357–369.

[13] Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland , G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (2000) The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235–242.

[14] Ponder, J. W. and Case, D. A. (2003) Force fields for protein simulations. *Adv. Protein Chem.* 66, 27–85.

[15] Schroeder, S. G. and Samudzi, C. T. (1997) Structural studies of EcoRII methylase: exploring similarities among methylases. *Protein Eng.* 10, 1385–1393.

[16] Smith, S. S. (2001) A self-assembling nanoscale camshaft: implications for nanoscale materials and devices constructed from proteins and nucleic acids. *Nano Lett.* 1, 51–56.

[17] Topfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J., and Steinbiss, H. H. (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res.* 15, 5890.

[18] Kosykh, V. G., Solonin, A. S., Buryanov Y. I., and Bayev, A. A. (1981) Overproduction of the EcoRII endonuclease and methylase by Escherichia coli strains carrying recombinant plasmids constructed in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 655, 102–106.

[19] Buryanov, Y. I., Bogdarina, I. G., and Bayev, A. A. (1978) Site specificity and chromatographic properties of E. coli K12 and EcoRII DNA-cytosine methylases. *FEBS Lett.* 88, 251–254.

[20] Clark, J., Shevchuk, T., Swiderski, P. M., Dabur, R., Crocitto, L. E., Buryanov, Y. I., and Smith, S. S. (2003) Mobility-shift analysis with microfluidics chips. *Biotechniques* 35, 548–554.

[21] Richards, E. J. and Elgin, S. C. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108, 489–500.

[22] Smith, S. S. and Crocitto, L. (1999) DNA methylation in eukaryotic chromosome stability revisited: DNA methyltransferase in the management of DNA conformation space. *Mol. Carcinog.* 26, 1–9.

[23] Smith, S. S. (2000) Gilbert's conjecture: the search for DNA (cytosine-5) demethylases and the emergence of new functions for eukaryotic DNA (cytosine- 5) methyltransferases. *J. Mol. Biol.* 302, 1–7.

[24] Baylin, S. and Bestor, T. H. (2002) Altered methylation patterns in cancer cell genomes: cause or consequence? *Cancer Cell* 1, 299–305.

[25] Smith, S. S. (1994) Biological implications of the mechanism of action of human DNA (cytosine-5)methyltransferase. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 49, 65–111.

[26] Smith, S. S., Laayoun, A., Lingeman, R. G., Baker, D. J., and Riley, J. (1994) Hypermethylation of telomere-like foldbacks at codon 12 of the human c-Ha-ras gene and the trinucleotide repeat of the FMR-1 gene of fragile X. *J. Mol. Biol.* 243, 143–151.

[27] Chiurazzi, P., Pomponi, M. G., Pietrobono, R., Bakker, C. E., Neri, G., and Oostra, B. A. (1999) Synergistic effect of histone hyperacetylation and DNA demethylation in the reactivation of the FMR1 gene. *Hum. Mol. Genet.* 8, 2317–2323.

[28] Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myohanen, S., Herman, J. G., and Baylin, S. B. (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat. Genet.* 21, 103–107.

[29] Goffin, J. and Eisenhauer, E. (2002) DNA methyltransferase inhibitors: state of the art. *Ann. Oncol.* 13, 1699–1716.

[30] Brown, R. and Strathdee, G. (2002) Epigenetic cancer therapies: DNA methyltransferase inhibitors. *Expert Opin. Investig. Drugs* 11, 747–754.

[31] Christman, J. K. (2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21, 5483–5495.

[32] Stewart, D. J., Donehower, R. C., Eisenhauer, E. A., Wainman, N., Shah, A. K., Bonfils, C., MacLeod, A. R., Besterman, J. M., and Reid, G. K. (2003) A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the DNA methyltransferase 1 inhibitor MG98 administered twice weekly. *Ann. Oncol.* 14, 766–774.

[33] El-Osta, A. (2003) On the use of DNA methylation inhibitors and the reversal of transcriptional silencing. *Blood* 101, 1656; author reply 1657, 1658.

[34] Momparler, R. L., Rivard, G. E., and Gyger, M. (1985) Clinical trial on 5-aza-2'- deoxycytidine in patients with acute leukemia. *Pharmacol. Ther.* 30, 277–286.

[35] Creagan, E. T., Schaid, D. J., Hartmann, L. C., and Loprinzi, C. L.(1993)Aphase II study of 5, 6-dihydro-5-azacytidine hydrochloride in disseminated malignant melanoma. *Am. J. Clin. Oncol.* 16, 243, 244.

[36] Thibault, A., Figg, W. D., Bergan, R. C., Lush, R. M., Myers, C. E., Tompkins, A., Reed, E., and Samid, D. (1998) A phase II study of 5-aza-2'deoxycytidine (decitabine) in hormone independent metastatic (D2) prostate cancer. *Tumori* 84, 87–89.

[37] Smith, S. S., Lingeman, R. G., and Kaplan, B. E. (1992) Recognition of foldback DNA by the human DNA (cytosine-5-)-methyltransferase. *Biochemistry* 31, 850–854.

[38] Smith, S. S., Kaplan, B. E., Sowers, L. C., and Newman, E. M. (1992) Mechanism of human methyl-directed DNA methyltransferase and the fidelity of cytosine methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4744–4748.

[39] Knox, J. D., Araujo, F. D., Bigey, P., Slack, A. D., Price, G. B., Zannis-Hadjopoulos, M., and Szyf, M. (2000) Inhibition of DNA methyltransferase inhibits DNA replication. *J. Biol. Chem.* 275, 17, 986–17, 990.

[40] Bigey, P., Knox, J. D., Croteau, S., Bhattacharya, S. K., Theberge, J., and Szyf, M. (1999) Modified oligonucleotides as bona fide antagonists of proteins interacting with DNA: hairpin antagonists of the human DNA methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 274, 4594–4606.

[41] Smith, S. S. and Kaplan, B. E. (1996) Mechanism-based inhibitors of DNA methyltransferase. US patent 5, 503, 975.

[42] Kho, M. R., Baker, D. J., Laayoun, A., and Smith, S. S. (1998) Stalling of human DNA (cytosine-5) methyltransferase at single-strand conformers from a site of dynamic mutation. *J. Mol. Biol.* 275, 67–79.

[43] Clark, J., Shevchuk, T., Kho, M. R., and Smith, S. S. (2003) Methods for the design and analysis of oligodeoxynucleotide-based DNA (cytosine-5)methyl-transferase inhibitors. *Anal. Biochem.* 321, 50–64.

[44] Wendel, J. A. and Smith, S. S. (1998) Uracil as an alternative to 5-fluorocytosine in addressable protein targeting. *Nanotechnology* 9, 297–304.

[45] Zhou, L., Cheng, X., Connolly, B. A., Dickman, M. J., Hurd, P. J., and Hornby, D. P. (2002) Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *J. Mol. Biol.* 321, 591–599.

[46] Smith, S. S., Lingeman, R. G., and Kaplan, B. E. (1992) Recognition of foldback DNA by the human DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *Biochemistry* 31, 850–854.

[47] Christman, J. K., Sheikhnejad, G., Marasco, C. J., and Sufrin, J. R. (1995) 5-Methyl-2'-deoxycytidine in single-strand ed DNA can act in cis to signal de novo DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7347–7351.

[48] Laayoun, A. and Smith, S. S. (1995) Methylation of slipped duplexes, snapbacks and cruciforms by human DNA(cytosine-5)methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 23, 1584–1589.

[49] Szyf, M. (1998) Targeting DNA methyltransferase in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 17, 219–231.

[50] Smith, S. S., Hardy, T. A., and Baker, D. J. (1987) Human DNA (cytosine-5)methyltransferase selectively methylates duplex DNA containing mispairs. *Nucleic Acids Res.* 15, 6899–6916.

[51] Smith, S. S., Kan, J. L., Baker, D. J., Kaplan, B. E., and Dembek, P. (1991) Recognition of unusual DNA structures by human DNA (cytosine-5)methyl-transferase. *J. Mol. Biol.* 217, 39–51.

[52] Chaplin, M. F. and Bucke, C. (1990) *Enzyme Technology*, University Press, Cambridge.

[53] Warmuth, R. and Yoon, J. (2001) Recent highlights in hemicarcerand chemistry. *Acc. Chem. Res.* 34, 95–105.

[54] Smith, S. S. (2002) Designs for the self-assembly of open and closed macromo- lecular structures and a molecular switch using DNA methyltransferase to order proteins on nucleic acid scaffolds. *Nanotechnology* 13, 413–419.

[55] Niemeyer, C. M. (2000) Self-assembled nanostructures based on DNA: towards the development of nanobiotechnology. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 609–618.

[56] Fuller, R. A., Clark, J., Kretzner, L., Korns, D., Blair, S. L., Crocitto, L. E., and Smith, S. S. (2003) Use of microfluidics chips for the detection of human telomerase RNA. *Anal. Biochem.* 313, 331–334.

[57] Nachamkin, I., Panaro, N. J., Li, M., Ung, H., Yuen, P. K., Kricka, L. J., and Wilding, P. (2001) Agilent 2100 bioanalyzer for restriction fragment length polymorphism analysis of the Campylobacter jejuni flagellin gene. *J. Clin. Microbiol.* 39, 754–757.

第 15 章　DNA-蛋白质在载体膜上漂浮组装的生物工程和特征

Wilfrid Boireau, Anthony C. Duncan, Denis Pompon

概　述

本章介绍 P-DNA 设计，实用构建及特征，及其在建立新一代 DNA 芯片中的应用。P-DNA 是人工共价组装，包括能够与改性的磷脂结合的组氨酸标记头，来自于细胞色素 b5 的核心蛋白结构域，该结构域由遗传工程赋予了特异性光谱和电化学性质，它对作为衬垫的合成接头和充当探针的寡核苷酸非常有用。P-DNA 具有能够到与载体双分子层，包括镍-亚氨基二乙酸修饰的磷脂有效自我结合的性能。P-DNA 的结构和与互补寡核苷酸序列的相互作用，可以通过使用 Biacore 系统（Biomolecular interaction analysis 的缩写 Biacore，是一种检测生物大分子相互作用仪，译者注）或等效系统的表面等离子体共振进行实时监测。P-DNA 芯片具有独特的性能，包括可调表面密度的探针、与外部 DNA 非常低的非特异性相互作用、横向迁移性、最大限度地减少空间相互作用、杂交效率优化及单靶多位点探针潜在识别、完美定义和均质结构及允许高密度紧凑单层等。这种新装置的潜在应用是多方面的，包括高灵敏度和高选择性的芯片检测 DNA-DNA、DNA-RNA 或 DNA-蛋白质的相互作用。

关键词：DNA 芯片；超分子组装；表面等离子体共振；人工蛋白质-DNA 结构；支持膜；平级调动；细胞色素；动态

15.1　导　论

设计同时含有蛋白质和核酸的人工超分子组装仍然是一个挑战。文献中几种模型涉及这种分子的构建，以便开发 DNA 设备或生物电子设备。大多数 DNA 芯片的传感器，使用控制不佳的吸附或共价附着的探针，从而导致无法控制模式和几何设计，使应用受到严重的限制。对于生物无机设备的一个关键方面，是无机模板（或基片）与生物学部件的接触。生物分子与载体的强相互作用，产生损害自组织的随机固定化。生物分子结构由于与载体相互作用，自身经常变性，导致功能丧失。

为了从生物分子中分离无机载体，评估几种类型的功能化载体，其中包括模拟天然膜支持的脂质双层。大多数常见的基底可覆盖有水泡性扩散或朗缪尔-布洛杰特

（Langmuir-Blodgett）沉积层而产生的支撑膜。这样的双层有几个优点：①它作为缓冲隔离和保护金属或无机载体。②它含有仿生环境限制非特异性吸附和生物分子的变性。③它可以很容易功能化，通过漂浮人工锚定允许特异性生物分子，借助于疏水相互作用附着到双分子层上面，通过专门工程将生物分子连接到反面。这种界面赋予了独特性质，如锚定使保持紧贴表面的生物分子横向移动，而不是直接与载体相互作用。

本章介绍一种新型的分子设备，它结合蛋白质和核酸元件具有支持膜界面来设置高度有序的纳米结构的有趣生物传感器。这种乐高分子（Lego，是一种世界著名名牌积木玩具，后来发展成乐高智能机器人。译者注）由两部分组成：修饰寡核苷酸（通过同源双功能连接物共价连接到一个转基因蛋白质组成的超分子组装体）和一个支承双分子层（包括功能化的可以特异性捕捉先前组件的磷脂）。该装置具有两种独特性质，一种来自于浮动结构允许的横向移动，浮动结构又允许一些简单二维结构重组；另一种性质来自于嵌入重组蛋白的特异性，为设备设计添加光学和生物传感器至关重要的电子性能。本章还介绍了如何组装这种可以实现测定单分子相互作用或者在核酸中检测几何过渡响应蛋白或配体相互作用，建立构象敏感的设备和应用。

15.2 材　　料

二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱（DMPC）、二油酰磷脂酰胆碱（DOPC）和辛基糖苷购自 Sigma 公司（圣路易斯，密苏里州，美国）。1,2-二油酰-*sn*-甘油-3-[*N*-(5-氨基-1-羧基戊基)]亚氨基二乙酸琥珀酰基（DOGS）是极性脂质。顺-[$PtCl_2(NH_3)_2$]由 Johnson Matthey（伦敦，英国）慷慨提供、1,4-二[3′-(2′-吡啶二硫代)丙酰胺基]丁烷（DPDPB）由 Pierce 公司（罗克福德，伊利诺斯州，美国）提供。DPDPB 不溶于水性缓冲液和在稀释前首先溶解二甲基亚砜（DMSO）（20mmol/L）。寡核苷酸由 Eurogentec 提供。

表面等离子体共振（SPR）实验，在 BIAcore X 和 3000（BIAcore 公司，乌普萨拉，瑞典）25℃下运行，2～50μl/min 的流速，50mmol/L 磷酸钠溶液（pH 7.5）（缓冲液 P1）。传感器芯片 HPA 预涂十八烷基硫醇（OM）购自 BIAcore 公司或从标准 J1 芯片或试剂盒的 SIA 制备，过程如下：OM 在乙醇/水[4∶1（*V*/*V*）] 1mmol/L 溶液，用 Transsonic 310 以最大功率超声处理 20min。在氮气下干燥之前 J1 传感器芯片，处理过夜，并用超纯水乙醇和水漂洗。

单链 DNA（ssDNA）（5′-CTATCATTTGCTTACTATTC-3′）和互补的寡核苷酸由 Eurogentec 提供。DPDPB 不溶于水性缓冲液和最初溶解在 DMSO（20mmol/L）的储备溶液中。DPDPB 的浓度可通过分光光度计用 $A_{237nm}=1.2\times10^4(mol/L)^{-1}\cdot cm^{-1}$ 和 $A_{287nm}=8.8\times10^3(mol/L)^{-1}\cdot cm^{-1}$ 检测进行计算。直接监测或通过还原释放吡啶-2-硫酮[$A_{344nm}=8.08\times10^3(mol/L)^{-1}\cdot cm^{-1}$]的吸光度检测它的功能性。在缓冲液中，将修饰单链 DNA 与细胞色素 b5 与必须含有小于 10%（*V*/*V*）DMSO 的 DPDPB 混合。

15.3　方　　法

15.3.1　方案和仪器

15.3.1.1　细胞色素 b5 分子工程

作为氧化还原辅因子，细胞色素 b5 是含一个铁的原卟啉Ⅸ电子载体蛋白。该蛋白质是通过一个 C 端疏水性氨基酸序列，自然锚定到细胞的内质网上（图 15.1）。球状的氧化还原结构域是亲水性的，并且不与膜相互作用。该结构域特征为氧化形式在 413nm 具有高吸光度，转移到 423nm 光吸收减少。通过遗传工程，由人微粒体细胞色素 b5 衍生的一个工程蛋白（Hb5-[His]$_4$），导致 26 个 C 端氨基酸残基由—NGHHHH—$_{COOH}$序列所取代。这种工程蛋白是可溶的并呈现可以调节镍-亚氨基二乙酸端合成连接臂的 C 端组氨酸标记。

工程通过使用 5′-GGCTGGATCCTTAATGGTGGTGATGTCCGTTACTGGAACTAGAATCAATAGTAGTG-3′寡核苷酸作为反向引物，以及寡核苷酸替代 cDNA 可读框，5′端 24 个第一碱基直接作引物，经过聚合酶链反应扩增，完成 Hb5 cDNA 合成。用 TOPO TA 克隆试剂盒（Invitrogen，卡尔斯巴德，CA）将扩增的 cDNA 亚克隆入 pCR®2.1-TOPO®，并通过测序进行检查。从 pCR2.1 中提取 Hb5-(His)$_4$ 编码序列，由限制性内切酶 *Sph*I-*Bam*HI 双重消化，并连接到 *Sph*I-*Bam*H Ⅰ 消化的 pUHE25-2 表达载体上，产生 pUHE-[Hb5-(His)$_4$][1]。除了 C 端取代外，根据启动密码子，该载体表达含有一个额外亮氨酸残基的细胞色素 b5 蛋白。

根据说明书，用迅速变更位点定向诱变试剂盒，对 pUHE-[Hb5-(His)$_4$]进行定点突变，将 Hb5-(His)$_4$ 24 位丝氨酸（人类原始 B5 的 23 位丝氨酸）改变为半胱氨酸。通过测序检查突变情况。

15.3.1.2　工程细胞色素 b5 的表达

相同的过程被用于[Hb5-(His)$_4$]和它的 S24C 衍生物的表达。将 pUHE-[Hb5-(His)$_4$]转化到 XL1-Blue™ 细胞，在补充有氨苄青霉素（100mg/L）的 1L Terrific 肉汤培养基中，室温下培养 48h。异丙基硫代半乳糖苷和 δ-氨基乙酰丙酸盐酸盐（Sigma）加入到最终浓度 0.5mmol/L，OD_{600} 达到 10。在 24℃下诱导 30h。收获细胞，并再悬浮于 50ml 20mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中。用溶菌酶（1.25mg/ml）破坏细胞壁，在鸡尾蛋白酶抑制剂、DNA 酶（Sigma）和 RNA 酶（Boehringer）存在的情况下，4℃进行超声波处理（4s×180s，拥有 50%的活性）。将 10 000*g* 离心的上清液用 25ml 缓冲液 P1 平衡的，固定化于琼脂糖上 Ni^{2+}/亚氨基二乙酸 1.5cm×7cm 柱中。用缓冲液 P1 彻底洗涤柱子后，用 1mg/ml L-组氨酸溶液洗脱[Hb5-(His)$_4$]。纯化，通过质谱分析蛋白质（观察值=13 109；预期值=13 129）。

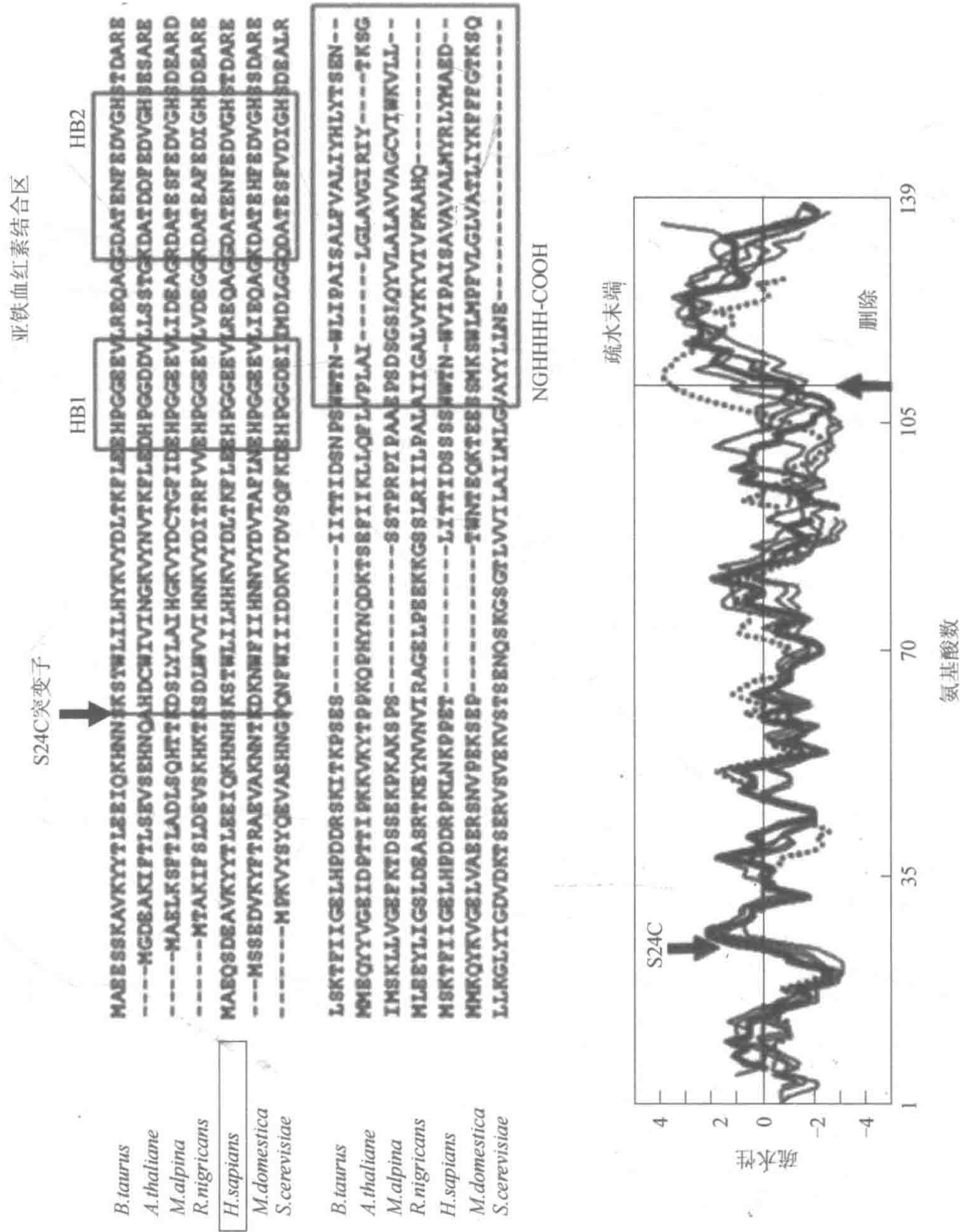


图 15.1　微粒体的细胞色素 b5 的序列比对。来自于哺乳动物、昆虫、植物和真菌起源的序列比对。（上图）HB1 和 HB2 框表明周围是配体血红素铁组氨酸残留的保守的序列。S24C 标记的突变位置，人类的序列中引入唯一的半胱氨酰残基。大框显示疏水的 C 端序列尾将天然酶锚定到材膜上和设计 C 端序列（粗体大字母）上。（下图）对应疏水指数剖面。在 S24C 箭头指示突变位置。标记为"删除"的框内表示已删除的疏水性 C 端序列。B. *taurus*. 家牛；A. *thaliana*. 阿拉伯拟南芥；*M. alpina*. 高山被孢霉；*R. nigricans*. 黑根霉；*H. sapians*. 人；*M. domestica*. 富士苹果；*S. cerevisiae*. 酿酒酵母

15.3.1.3　工程细胞色素 b5 经顺铂桥单链 DNA 的耦合

为了与 ssDNA 和细胞色素 b5 之间构建共价连接，将顺-$[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$用作一种交联试剂。这种方法的优点是，在蛋白质和核酸之间形成短链，而保留 ssDNA 基团大部分的杂交性质。缺点是需要特异性核酸序列，包括作为顺铂连接 N7 位点靶独特的鸟嘌呤[2]。用顺-$[Pt(NO_3)_2(NH_3)_2]$在水中溶解悬浮制备顺-$[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$（顺铂），使用顺-$[PtCl_2(NH_3)_2]$与硝酸银反应形成。根据模型 DNA 适合的要求，选择单链 DNA 寡核苷酸（5′-CTATCATTTGCTTACTATTC-3′）。甲基化分析和 Maxam-Gilbert 测序[3,4]表明单一的铂酸盐出现在寡核苷酸上独特鸟嘌呤的 N7 位点。

顺铂与[Hb5-(His)$_4$]和 ssDNA（100～200μmol/L）结合的形成物，在缓冲液 P1 存在 5 摩尔当量铂络合物的情况下 25℃保温 5h。由此产生的复合物（90μmol/L）与 1.5 当量的 ssDNA 25℃保温 50h。用固定化于琼脂糖上 Ni^{2+}亚氨基二乙酸从过量试剂中，分离纯化[Hb5-(His)$_4$]-Pt-ssDNA（P-DNA）。用 P1 缓冲液中 1mol/L 咪唑乙酸洗脱这种蛋白质。纯化步骤中，采用的 5′端 ^{32}P 标记 DNA 无线探测器和 413nm 光吸收监测细胞色素 b5，用 260nm 对 DNA 进行监测。基于[Hb5-(His)$_4$]的 ε_{413nm}=117（mmol/L）$^{-1}$·cm^{-1} 和 ssDNA 的 ε_{260nm}=180（mmol/L）$^{-1}$·cm^{-1}，其结果与[Hb5-(His)$_4$]和 ssDNA 之间形成的等分子复合物相一致。用十二烷基硫酸盐聚丙烯酰胺凝胶电泳分析对对照组 P-DNA 结构例行评估[5]。

15.3.1.4　通过同型双功能交联剂对工程细胞色素 b5 ssDNA 的耦合

构思的另一种战略是能够将任何类型的核酸与细胞色素 b5 相结合。这一战略包括通过定点突变技术，在细胞色素 b5 上为双功能交联剂创建独特的附着位点，也能够与修饰的核酸偶联。同型双功能连接臂 DPDPB 是 16Å 的连接臂，该连接臂可以与含巯基的 ssDNA 和蛋白质两者形成二硫键（图 15.2）。通过巯基与 3′端或 5′端经$(—CH_2—)_3$或$(—CH_2—)_6$隔开，连接修饰的 ssDNA（由 Eurogentec 提供）。未修饰的细胞色素 b5，不包含内生半胱氨酰残基。在蛋白质外围，添加易溶的半胱氨酸进行 S24C 突变，不会干扰细胞色素折叠（它的光谱和电化学性能保留）。基于三维结构，该替代物远离 C 端的组氨酸标记，从而使细胞色素 b5 与外部元件的连接独立和无相互作用。

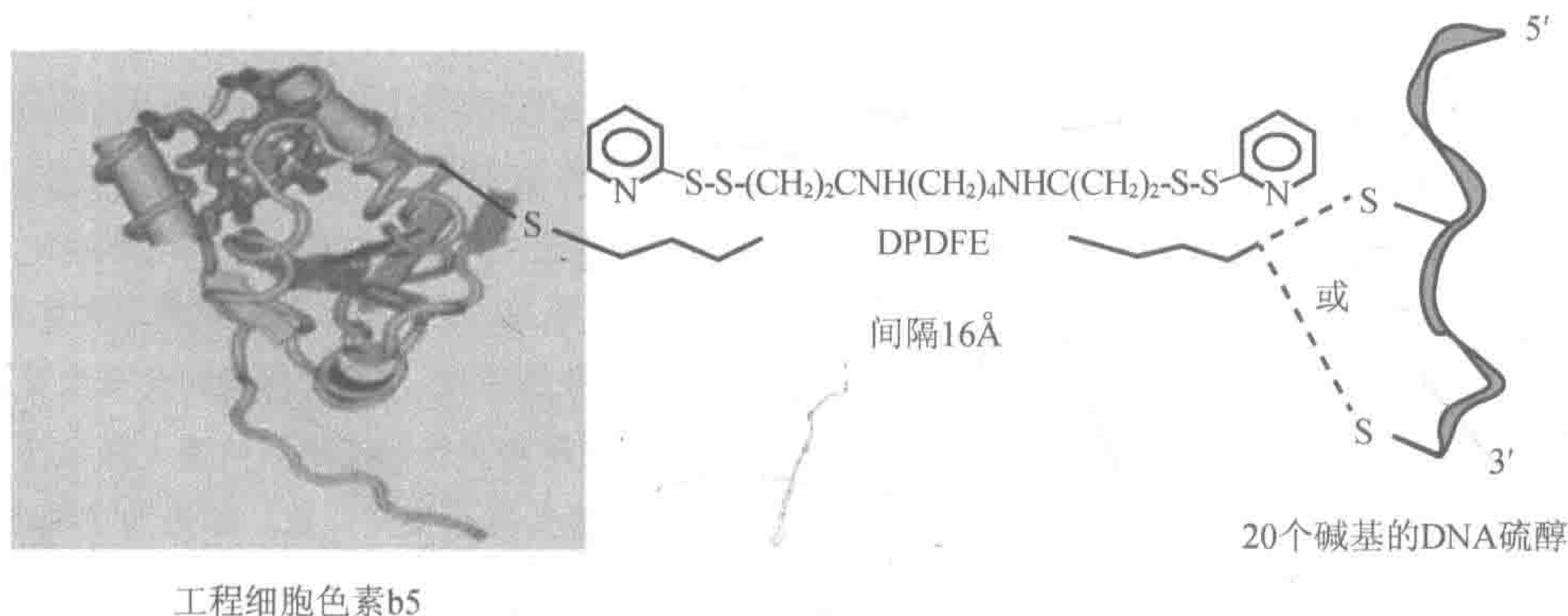


图 15.2　DPDPB 耦合 P-DNA 的结构示意图。细胞色素 b5 通过 DPDPB 双功能连接臂耦合到 ssDNA。DPDPB 反应导致 16Å 连接臂插入细胞色素 b5 巯基和巯基修饰的寡核苷酸之间

1．寡核苷酸与 DPDPB 耦合

设计了一个特定的方案优化加合物合成。巯基 ssDNA 溶液与 1∶100 的分子比的二硫苏糖醇（DTT）在 30℃保温 10min 以切除先前存在的二硫桥。ssDNA 与 DPDPB 试剂偶联之前必须消除未反应的过量 DTT。为此用葡聚糖凝胶 G25（Pharmacia）进行凝胶排阻层析。脱盐 ssDNA 和 DPDPB 之间以 1∶20 摩尔比 30℃偶联 4h。在该步骤中，耦合的 ssDNA 经弱阴离子交换柱（DEAE-纤维素；Pharmacia）从过量试剂中纯化。低盐（0.1mol/L 氯化钠）洗涤后，用 1.5mol/L 氯化钠洗脱 ssDNA-PB 加合物。这就获得了高浓度的 ssDNA-PB 加合物组分，从中取出少量（1nmol）样品进行偶联效率评价。监测 344nm 光吸收变化，接着加入过量的二硫苏糖醇。这种化学裂解使连接体未偶联末端释放吡啶-2-硫酮，用 344nm[$8.1\times10^3(\text{mol/L})^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]监测，如图 15.3 所示。发现高达 80%的初始单链 DNA 与 DPDPB 偶联，ssDNA-PB 加合物在 4℃放几天而没有任何活性损失（见 15.4 节注意事项 1）。

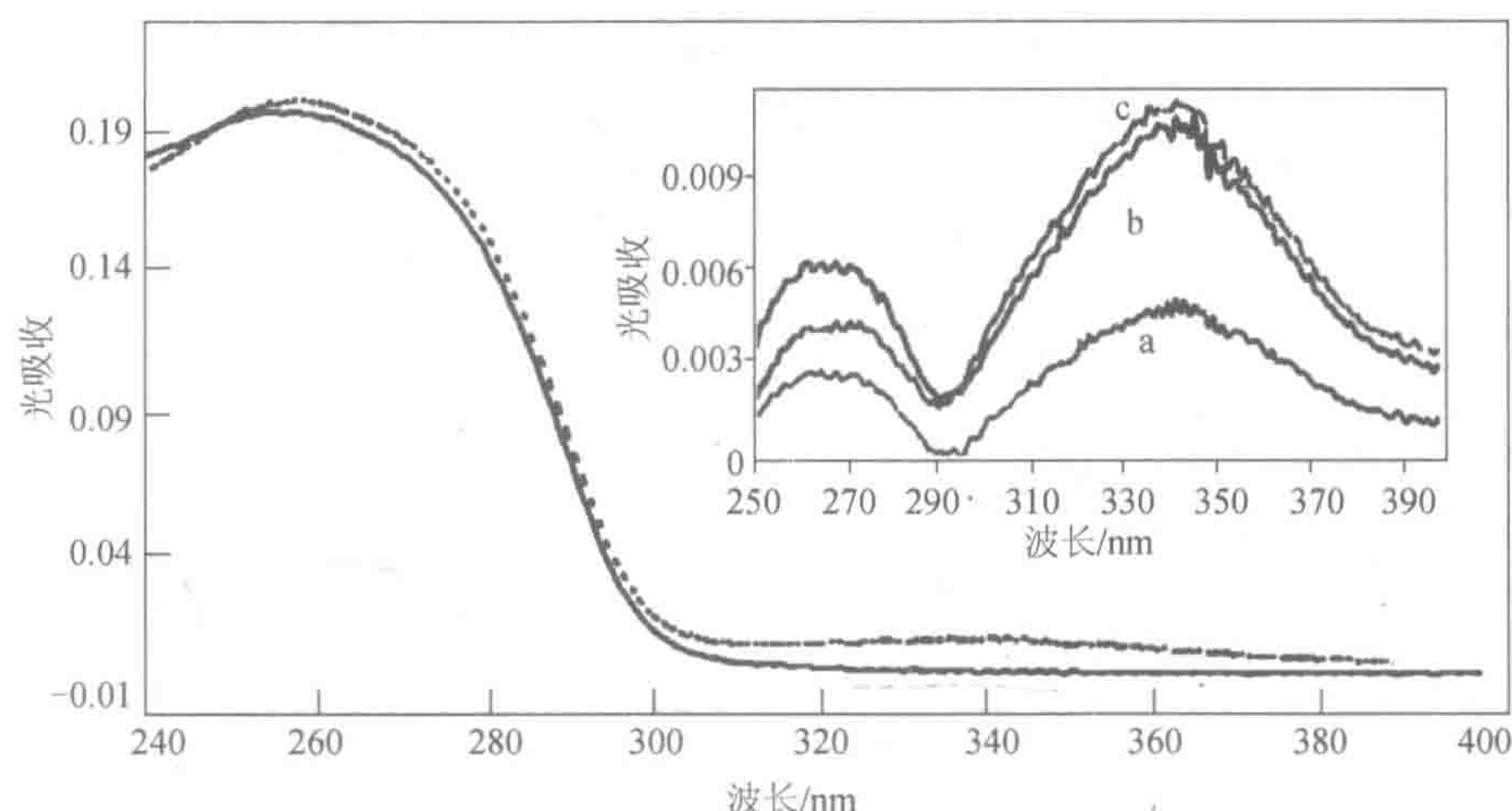


图 15.3　DPDPB 和 ssDNA 之间加合物的光谱特征。按文本中所述进行偶联和纯化。记录之前的 ssDNA 与 DPDPB 混合（实线）、偶联和纯化后（虚线）的光谱。滴定剩余的噻吩并吡啶，加合物上官能团化可以由 DTT 完成切除，使强烈吸收的吡啶-2-硫酮生色团释放[$\varepsilon_{343\text{nm}}=8080(\text{mol/L})^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]。增加 DTT/加合物的摩尔比使 $A_{343\text{nm}}$ 信号的相应升幅到饱和：(a)10/1，(b)50/1，(c)100/1

2．$\text{Hb}_5\text{-(His)}_4$ 蛋白与 ssDNA-PB 加合物的 S24C 突变体的耦合

组装形成的第二步骤涉及蛋白质与 ssDNA-PB 加合物的反应。在含半胱氨酸蛋白质的纯化过程中，我们发现通过二硫键高水平自发形成二聚体。修饰的寡核苷酸（相同时间、温度和摩尔比）如已经描述的一样，由纯化蛋白质与 DTT 孵育减少了二聚体的量。同样，偶联步骤之前用 Sephadex G50 快速凝胶层析立即除去过量的 DTT。蛋白质洗脱到柱的死体积，并直接收集纯化的 ssDNA-PB 加合物溶液，以使 10 摩尔比的修饰寡核苷酸达到最终摩尔比为 1 的蛋白质。

室温下，缓冲液 P1 中至少耦合 2h 后，通过组合层析纯化最终加合物。用金属螯合层析法，消除所有的组氨酸标签——游离物（即非蛋白物）。接着用生理盐水溶液洗涤，镍-亚氨基二乙酸柱用组氨酸的溶液（1mg/ml）或 EDTA（1mmol/L）洗脱。3 种物质可

能仍共存于洗脱液中：单体、未偶联蛋白质的二聚体和复合物。最后的纯化是通过将先前洗脱液加载到能结合 3 种物质但亲和力不同的 DEAE 琼脂糖凝胶柱上。由于 DNA 磷酸基团的负电荷，P-DNA 复合体比未偶联的蛋白质结合更紧密。盐梯度使各种物质逐渐洗脱，如图 15.4 所示。P-DNA 在较高盐浓度条件下洗脱。通常，这种方法可得到高产率的合成 P-DNA（高达 75%）。将 P-DNA 进行分光光度分析，并与那些未偶联的细胞色素 b5 和单链 DNA 大分子进行光谱性质比较（图 15.5）。P-DNA 展现对应于核酸和蛋白质部分的两个主要的吸收峰分别在 260nm 和 412nm。为了计算 260nm 处的吸光度，必须校正 Hb5-(His)$_4$ 蛋白在此波长（约为 413nm 吸光值的 20%）的贡献。

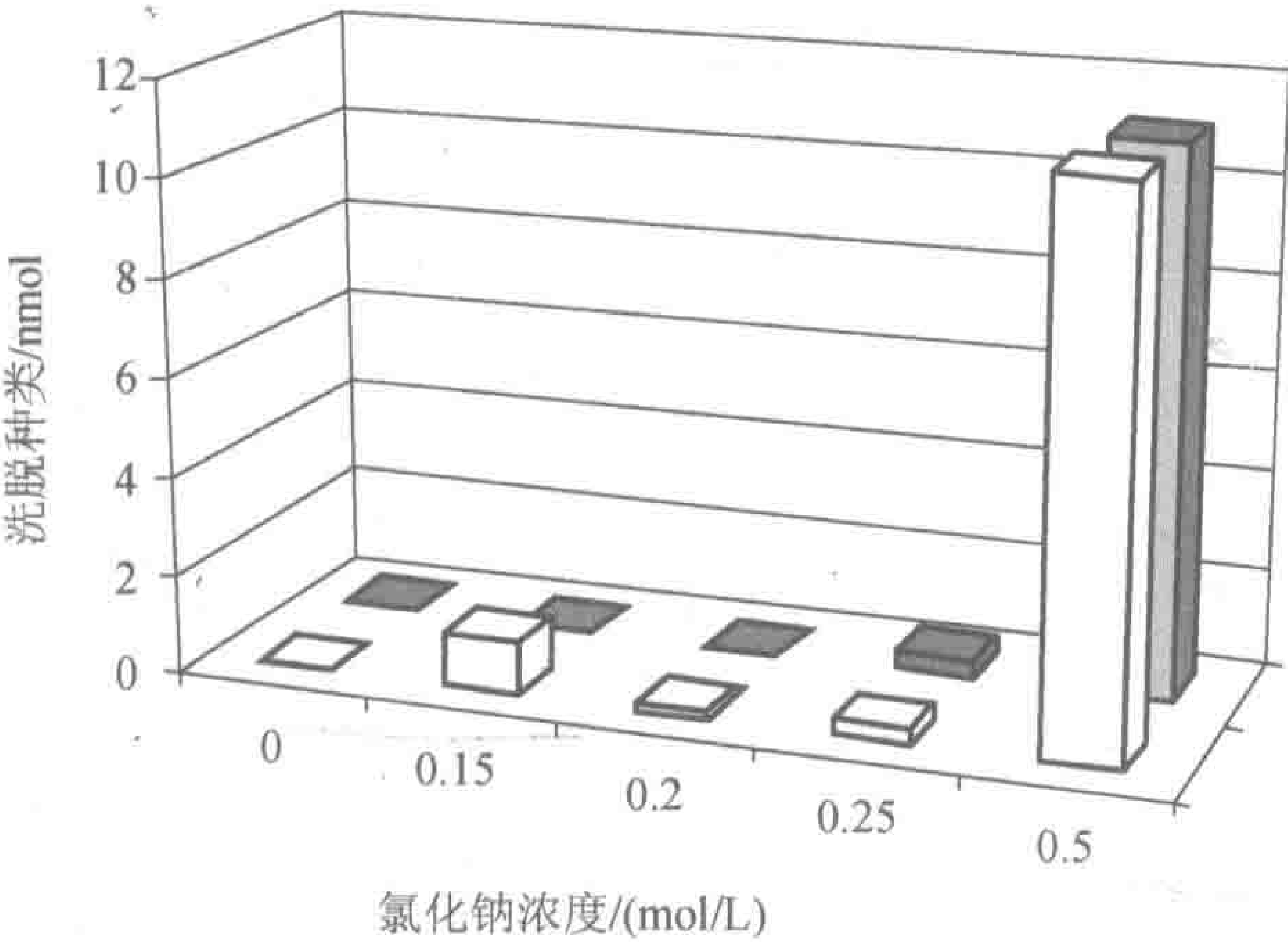


图 15.4　DEAE-纤维素柱纯化偶联 DPDPB 的 P-DNA 的洗脱曲线。如文中所述，层析步骤的组合要求获得纯的 P-DNA。最后一步涉及阴离子交换柱（DEAE-纤维素）用以分离带负电荷的不同物质。盐梯度可以从 P-DNA 中分辨游离的细胞色素 b5。实心框表示从紫外吸收推导的 ssDNA 洗脱曲线；空心框代表从可见光吸收推断细胞色素 b5 洗脱曲线

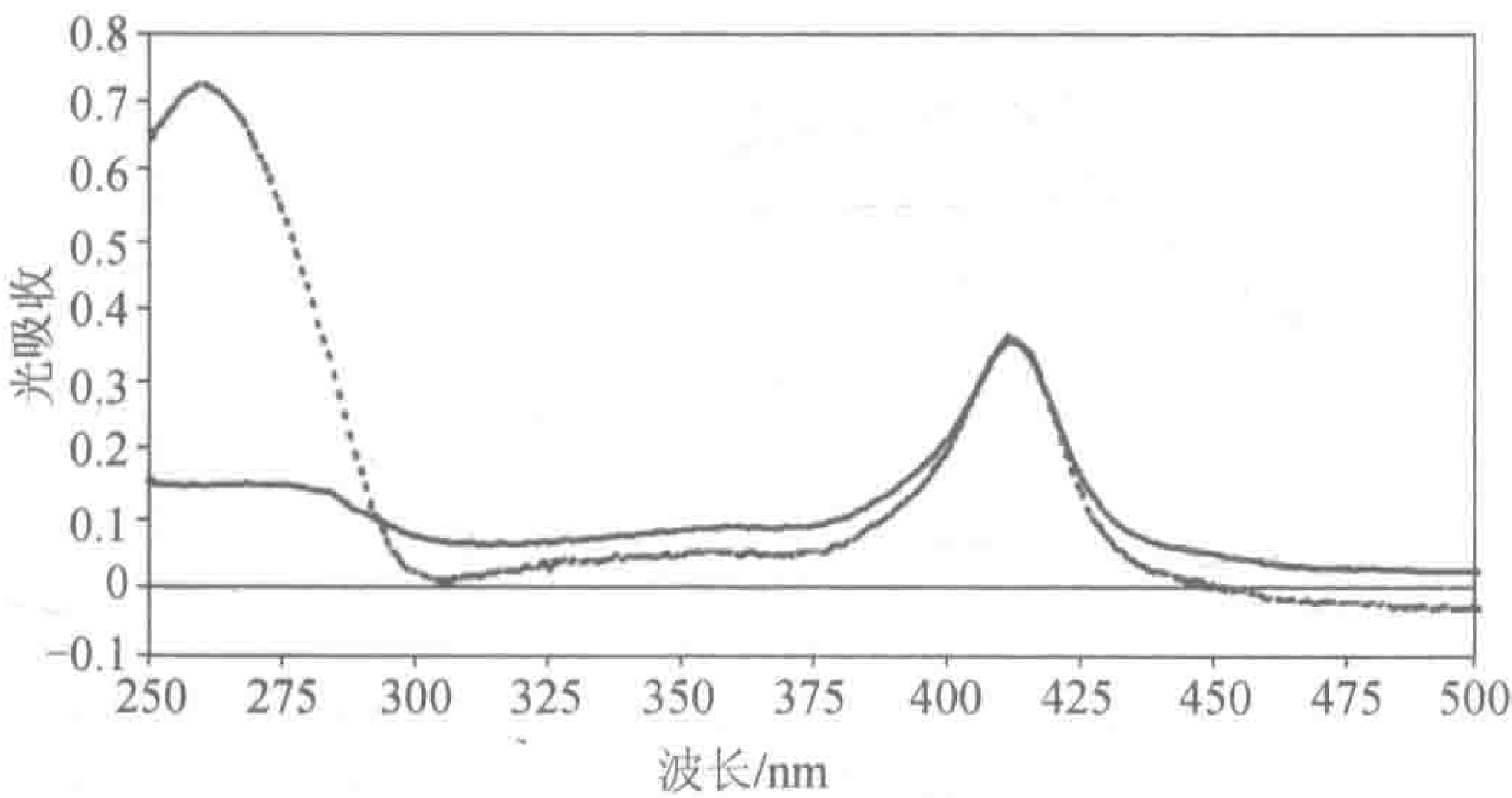


图 15.5　[Hb5]His$_4$ 和 P-DNA 的光谱特征。Hb5(His)$_4$（实线）和从 Hb5(His)$_4$ 与 ssDNA（虚线）DPDPB 介导连接得到的纯化 P-DNA 的吸收光谱

15.3.1.5　结论

高度有序的和均匀的超分子组装的形成，需要完全定义分子成分，能够在完全定义和独特的方式中结合在一起。因此，我们设计了一个小的球状蛋白，细胞色素 b5 表现出稳定的折叠，以及便于检测和表征的有用特定光谱和氧化还原特性。分子工程引入两种

类型的官能化：一种控制最终复合物与载体双层结合，另一种允许与核酸的部分独特连接。设计此连接，以避免蛋白质的结构受到任何干扰，其中最终复合物可以保持氧化还原和光谱性质不会发生改变。然而，这种连接使其有足够的分子内灵活性，从而限制甚至避免，来自于可能会影响核酸结构域杂交性能的蛋白质部分的任何干扰。使用远端同型双功能合成的交联剂，能进一步降低空间位阻，从而提高产量和增加特定 DNA 碱基配对识别。

在温和的反应条件下，设计具体优化方案，执行单链寡核苷酸与 DPDPB 偶联剂的反应。寡核苷酸-间隔加合物与蛋白质反应之前，设计仅需要非常有限加合物（$<$1nmol）的分光光度分析测定法，以便量化耦合效率。寡核苷酸-间隔加合物和蛋白质之间耦合的产率，还可以通过分光光度法分别在波长 260nm 和 412nm 利用明确定义的 DNA 和细胞色素 b5 的吸收作用进行评价。

15.3.2　P-DNA 的应用

生物传感器必须结合生物识别过程与信号转导过程，接下来才是检测。该检测灵敏度增大时检测系统的尺寸减小。表面等离子共振（SPR）技术是一种合适的检测系统，不要求任何样品初步标记来监控，并提供生物分子装配的实时动力学[6]。渐逝波的产生，需要充当组装载体的金属包被模板。在传感器的表面上，这些装置检测的折射率随时间而变化，对分子与表面的结合质量给出一个信号（传感）比例。随着界面与识别组件之间的距离超过 300nm，SPR 的灵敏度呈指数下降并变得可忽略不计。经典的生物传感器（BIAcore）技术灵敏度不是最佳，该技术必须基于芯片呈现 100nm 的聚合物缓冲垫（在金表面上的葡聚糖基底）。载体脂质膜产生了封闭空间距离，从而潜在优化了检测限制，还有限制非特异性相互作用的仿生特性。

15.3.2.1　金表面杂交双层的设置

杂交双层由致密十八烷基硫醇单层，自组装到游离浮动的磷脂上层覆盖的金基底上，磷脂层是通过脂质体悬浮液，与有机质功能化金衬底相互作用而获得[7]。混合双层形成的动力学，通过表面等离子共振技术监控。基于实验和理论校准，发现 1 个 RU 信号对于 1nm 厚单层来说，质量为 1pg/mm^2 [8]和 700 共振单位（RU）[9]。将磷脂（25℃ 1mmol/L 的缓冲液 P1）的小单层囊泡，与自组装有机质单层进行融合。为了达到高度包被单层，需要孵育 20min。为了除去过量的来自囊泡连锁的材料，将 20mmol/L 氢氧化钠溶液注入直到信号达到稳定为止（见 15.4 节注意事项 2）。通常，我们分别测量 1700 和 1900±300 振动单位融合值，即 DMPC 和 DOPC 囊泡。这与先前公布值一致[10]。尽管如此，重要的是通过注入一些极性的蛋白质，控制平面脂质上层的完整性。注射 1μmol/L Hb5-(His)$_4$ 溶液不会产生任何信号，表明与未覆盖的金或疏水层不会产生非特异性相互作用[5]。为了赋予载体膜金属螯合亲和性质，将 10%（摩尔）合成修饰磷脂（DOGS）带有镍-氨基二乙酸头，掺入到 DMPC 中或将含有微囊的 DOPC 用于熔化步骤。功能化和非功能化微囊同样接近 OM 单层（平整均匀杂交双层）（见 15.4 节注意事项 3）。

15.3.2.2 各种类型细胞色素 b5 与载体膜的相互作用

1. 天然人细胞色素 b5

天然人细胞色素 b5 是由 26 个氨基酸，以羧基为末端组成的跨膜锚定区的一种外膜蛋白。我们用 0.1～3μmol/L 浓度表面等离子共振（SPR），研究了这种蛋白质掺入到杂交双层。细胞色素 b5 在载体双层中展示了高亲和力，出人意料的是，通过破坏脂质层最高浓度测试中充当了大分子洗涤剂。基于 Langmuir 模型提出了 BIA 评估软件（BIAcore），评价了 20nmol/L 的离解常数，其中与兔细胞色素 b5 是同一数量级[11]。用适当浓度（即＜1μmol/L）细胞色素 b5 的单层，可以重构高度包被到生物传感器表面，从而产生 1000RU 的表面等离子共振信号，其中表现 8pmol/cm^2 的覆盖范围[12]。虽然这种膜蛋白对杂交双层有很强的亲和力，但一些因素造成了它的应用困难，诸如在溶液中聚合，洗涤剂增溶和双层分子的破坏等。

2. Hb5-(His)$_4$ 蛋白

前已报道，膜锚定的游离细胞色素 b5，含有 6 个组氨酸标签以相当高的亲和力（＞1μmol/L）掺入到金属螯合物单层[13]。在我们的例子中，—NGHHHH C 端延伸是加入删除了多肽性膜锚定的天然 C 端的修饰人细胞色素 b5。用表面等离子共振（SPR）分析 Hb5(His)$_4$ 蛋白与 DOGS 掺杂载体双层的结合（图 15.6 曲线 B）。有代表性的是，在 1μmol/L 的浓度下只注射 Hb5-(His)$_4$（图 15.6 曲线 B，步骤 1）。在缓冲液洗涤中观察到信号的少量减少，其中可能反映了热力学平衡的条件（图 15.6 曲线 B，步骤 2）。在脂质单层（10% DOGS）内过量脂质锚定条件下，信号达到脂质单层 200RU 经典值。注射游离的 L-组氨酸强烈降低信号，如预期的一样，镍-螯合剂有扰乱金属介导连接的能力。推导出了 Hb5-（His）$_4$ 的解离常数为 50nmol/L。这个值非常接近天然蛋白质的值，比酰化可溶性蛋白报道的（＞1mmol/L）值要低得多[14]。这是验证细胞色素 b5 分子工程策略的一个重要的结果，因为：①膜附着类型的修饰（螯合物与疏水结合）并没有改变脂质基质的亲和性；②与天然 b5 相反，使用工程蛋白不会破坏杂交双层（即使 25μmol/L 以上的高浓度），并不会与无 DOGS 杂交双层相互作用；③蛋白质层在温和的含水条件下，由螯合物竞争剂除去，这就很容易实现生物传感器再生。

15.3.2.3 P-DNA 芯片的构建

1. 各种 P-DNA 与杂交双层的相互作用

SPR 实验是用镍-亚氨基二乙酸功能化双层测试顺铂和 DPDPB 偶联的 P-DNA，形成超分子组装的能力。如图 15.6 所示，曲线 A，就像 Hb5-(His)$_4$ 一样，当在相同的条件下，注入 1μmol/L DPDPB 耦合 P-DNA 的溶液时，观察到 30RU 响应信号。为了达到类似于用 Hb5-(His)$_4$ 观察到的覆盖水平，必须更长时间注射。在实验条件下提高未偶联 Hb5-(His)$_4$ 的饱和度，P-DNA 的响应是远离饱和覆盖密度大约低于两倍。结合 20min 后，观察 300RU 与覆盖的 1.25pmol/cm^2 P-DNA 一致[5]。

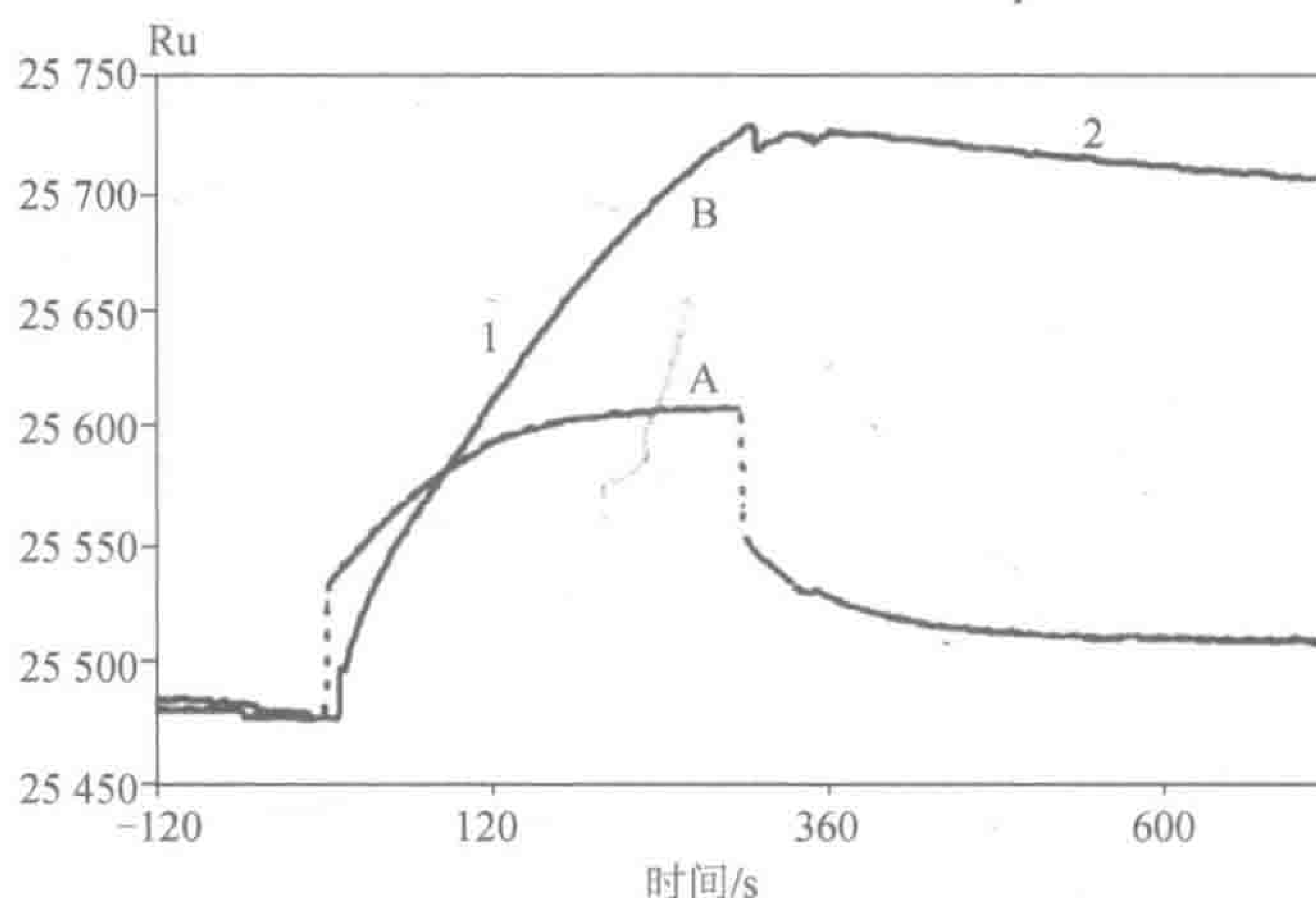


图 15.6 无 DNA Hb5-(His)$_4$ 的传感图和 P-DNA 与膜的相互作用。左基线对应于混合双层（DPMC/DOGS[10/1mol]）的结构。完成两次注射以便分析 Hb5-(His)$_4$（曲线 B）和 P-DNA 的（曲线 A）的结合/解离的动力学：1. 在 25℃下流速为 10μl/min 将 1μmol/L 的 Hb5-(His)$_4$ 和 P -DNA 加入；2. 洗涤

在 25℃ 0.1μmol/L 和 2.5μmol/L 的浓度范围内评价动力学常数，和为了载体的双层与所观察到的无 DNA 蛋白质相比，图示 P-DNA 的更低的亲和力（K_D=0.5～1μmol/L）。亲和力的降低可以由较大尺寸和强负电荷的 P-DNA，与未偶联的蛋白质相比来解释。因此，复合物的 ssDNA 部分，可能引入一些空间位阻及拥有双层复合物亲和力，一起减少带负电膜表面的一些静电排斥作用。然而，这种降低亲和力不是主要缺点，因为，发现一旦形成超分子复合物，就使大部分相互作用的发生足够稳定。这就表明，大尺寸复合物不会引起来自磷脂衬底脂质锚定的快速提取或螯合介导的连接快速断裂。初步实验表明，通过降低温度，复合物可以进一步稳定，诱导脂质层相变的可能原因，会降低双层脂质锚定的残余提取。

2．杂交的光谱和 SPR 分析

为了评估 ssDNA 杂交属性上蛋白质偶联的影响，通过对 P-DNA 的核酸部分游离的 ssDNA 序列互补杂交测定，形成双链 DNA 的解链温度。用 Bio-Tek 的软件在 Uvikon 941 分光光度计中，测定双链 DNA 的熔化温度。游离的 ssDNA 或 P-DNA（耦合顺铂）与互补的 ssDNA 在 0.1mol/L 的 NaClO$_4$，pH 为 4.0 中终浓度为 0.5μmol/L 温育。双链样品加热至 80℃（对游离的 ssDNA）或 65℃（用于 P-DNA），以 1℃/min 的速率降低温度至 2.5℃。监测 260nm 的吸光度变化。然后样品以 1℃/min 的加热速率从 2.5℃加热至 60℃，以便检查杂交和融合曲线一致。在 0.1mol/L 的 NaClO$_4$，pH 为 4.0 的熔融温度，发现游离双链和[Hb5-(His)$_4$]复合物分别是 45℃和 23℃（图 15.7）。这个结果表明，双链 DNA 的稳定性显著地减少了与[Hb5-(His)$_4$]的偶联。由于鸟嘌呤镀铂，可能促成蛋白质部分空间相互作用，或双链 DNA 的几何失真的现象[15]。然而，显示出明显的单步转变 P-DNA 的融合曲线表明，出现真正的杂交而不是出现一些非特异性相互作用。此外，具有相似

长度无关的 DNA 序列，在对照实验中不显示出任何信号[5]。

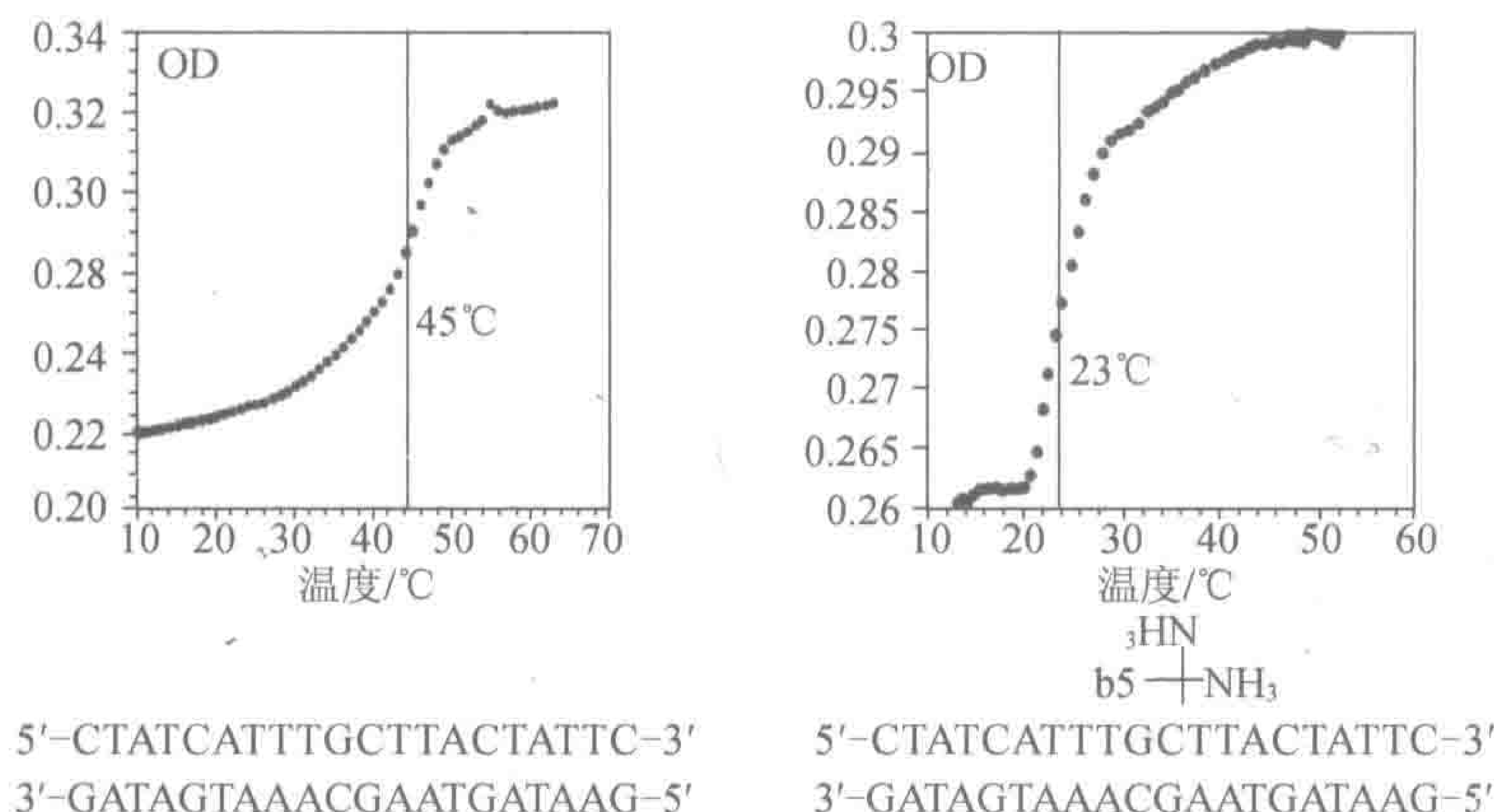


图 15.7　双链游离 DNA 和顺铂耦合的 P-DNA 的熔解分析。每 20 个碱基长度的双链寡核苷酸的熔化通过 260nm 在 0.1mol/L 的 $NaClO_4$，pH 为 4.0 中以 1℃/min 的温度扫描速率分析双光学吸附

双层包被的 P-DNA（1pmol/cm^2 膜）与互补核苷酸序列的杂交，在低于 30℃的不同的温度中来实现。在这样的条件下，基于先前融合曲线分析，发现溶液中复合物内的双链 DNA 是稳定的。将互补的 ssDNA（在缓冲液中 P1 中 50μg/ml 或缓冲磷酸盐）注射到膜结合装置中。基于 RU 信号，只有氯化钠浓度大于 150mmol/L 时观察到杂交（图 15.8）。随着离子强度的增加，DNA 负电荷的静电斥力减少，这一结果与 DNA 双链体预期稳定性相一致。在这种条件下，观察到 55RU 的响应，为完整的杂交的一半。此外，当注入非互补的 ssDNA 时，没有观察到信号，强烈提示，观测信号来自特异性相互作用结果。

15.3.2.4　P-DNA 芯片的独特性质

所设计的设备与在经典 DNA 芯片中随机一次观察到的结果相比有更好定义的分子系统性，经典 DNA 芯片一般由对核酸无特异性结合的正电荷多聚物组成的定义不清的载体层，载体层上寡聚探针随机沉淀所组成。因为这种相互作用的亲和力非常有限，一般需要附加核酸交联以便稳定设备。这种交联可能部分降低了核酸的特性。数据表明，在这样典型的芯片中，只有百分之几的探针真正易于杂交，因而极大地限制了它的灵敏度。由于带负电荷的载体膜不与 DNA 相互作用，P-DNA 概念上是非特异性相互作用最小化，相反，它通过在远离界面溶液中探针寡核苷酸碱基配对，特异性识别表现出最大化。此外，该设备独特的横向迁移性能，即使在探针高饱和的条件下，也有利于探针无障碍工作。

P-DNA 芯片设计包括精确控制固定化探针的密度到仿生层，对特殊的应用要优化灵敏度和特异性之间的比率。覆盖密度可通过 SPR 接口进行获取。传感器上磷脂、细胞色素 b5 和 P-DNA 饱和密度计算总结于图 15.9。SPR 显著的优点是它允许在脂层中 DOGS

剂量变化时实时监测密度变化。另一个优点是能控制芯片再生自组装反应的可逆性（图 15.10）。

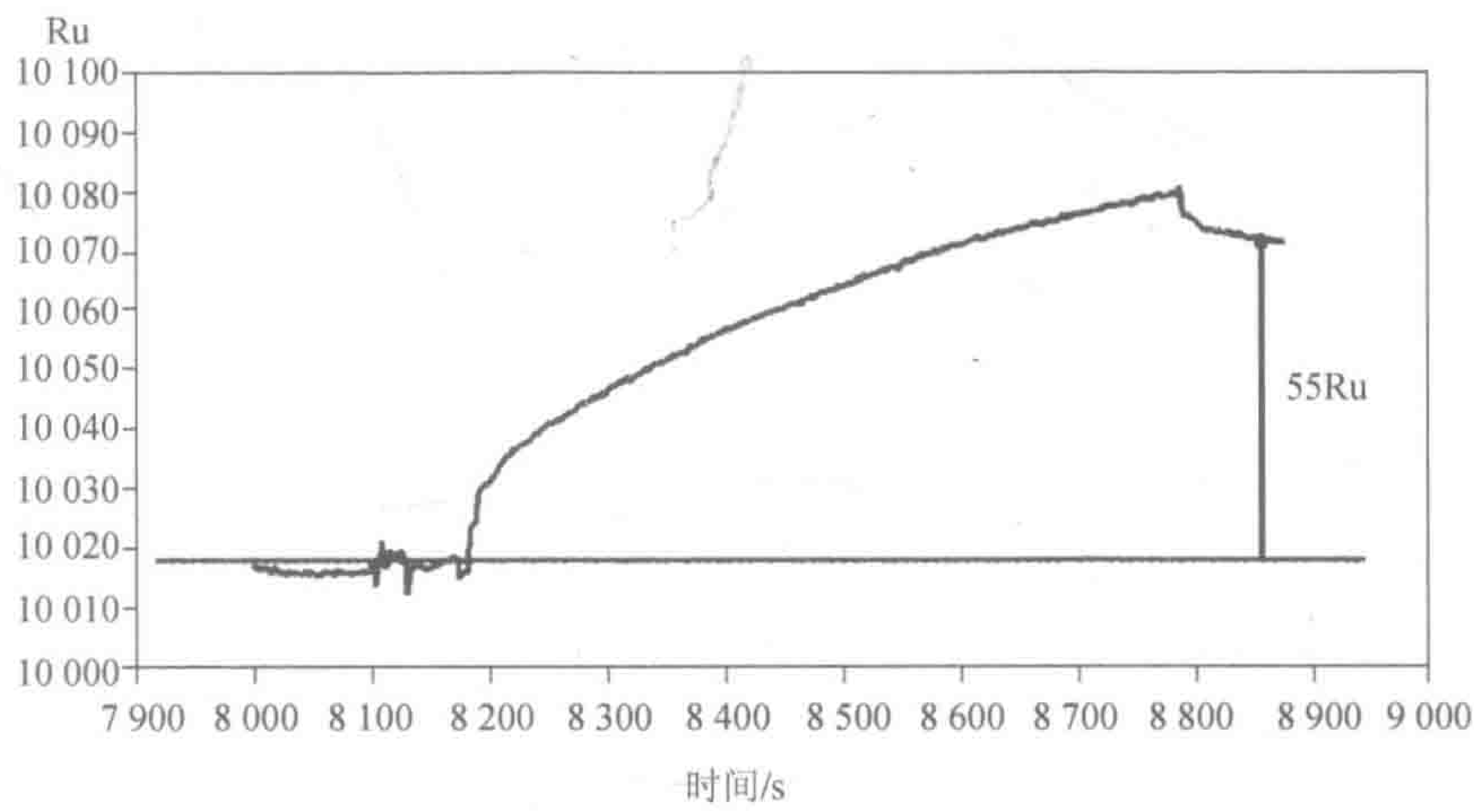


图 15.8　DPDPB 耦合 P-DNA 与互补寡核苷酸的 SPR 杂交。初始基线相当于 1.25pmol/cm^2 的 P-DNA 沉积到脂质上层。洗涤后单次注射互补的单链 DNA 产生的特异性稳定相关响应（55RU）。互补的 ssDNA 浓度为 25μg/μl，在 25℃注射过程中的流量为 10μl/min

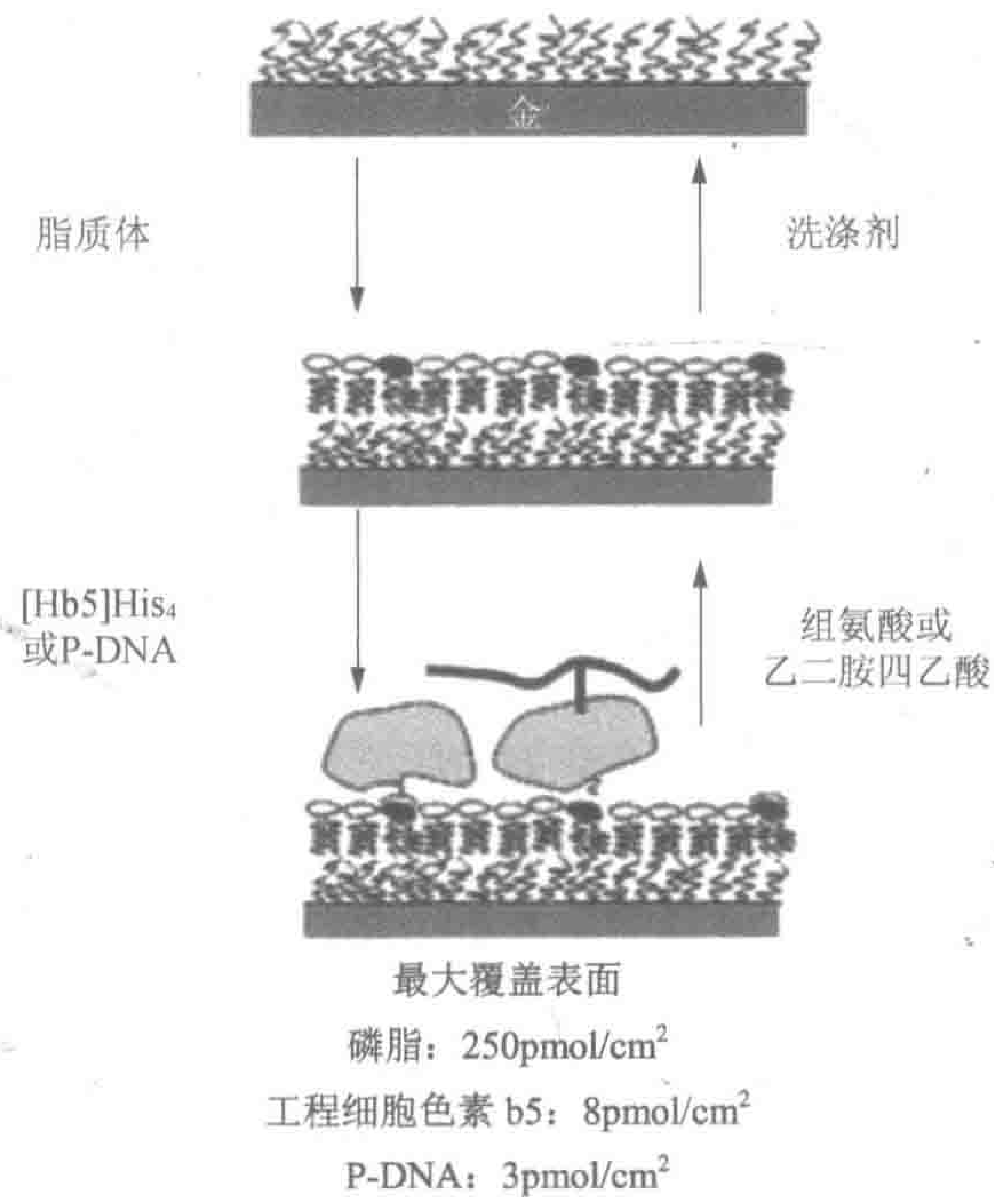


图 15.9　P-DNA 的可逆自组装示意图

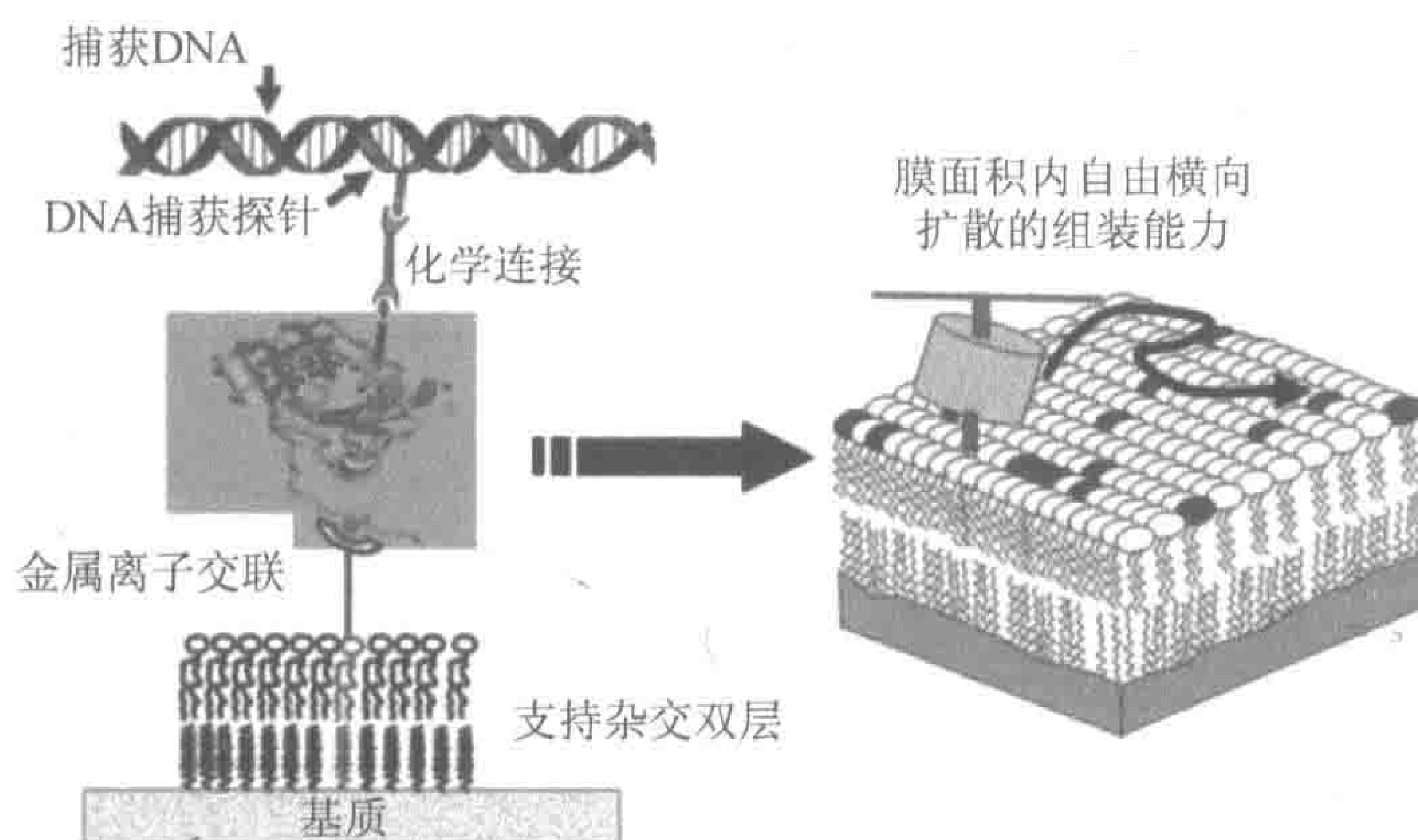


图 15.10　P-DNA 作为浮动 DNA 传感器横向扩散能力

15.4　注 意 事 项

1.　为细胞色素 b5 与寡聚探针工程耦合提出的策略，涉及同型双功能连接臂和硫醇化的寡核苷酸。这种方法效果很好，但实现比较棘手，因为在重现合成质量好的巯基寡核苷酸，要不这样合成的成本高，要不巯基化 DNA 需要依赖氧进行氧化处理，需要用同型功能化连接臂严格控制偶联步骤，以避免形成细胞色素 b5 或寡探针同型二聚体，导致最终复合物产生的减少而需要良好的纯化。为了克服这些缺点，最近我们用氨基改性替代硫醇化寡核苷酸的方法修改了程序。这种氨基改性寡核苷酸探针（市售的 3′-、5′-或内部碱基修饰）是广泛用于经典的芯片技术；它们也是低成本合成的。同型双功能连接子具有异双功能连接臂包括硫醇反应性和胺反应性末端。适用的大量此类连接臂来源于商品。首先完成连接臂与寡探针的耦合。这导致了可能单一的产品而不可能形成二聚体。然后，如先前同型双功能连接臂描述的一样，将纯化的加合物连接到修饰的细胞色素 b5。全球范围内都在为产量的提高和构建步骤成本和数量的减少而努力。

2.　脂质体（或小单层脂囊）融合载体的脂质双层的自组装，在经典著作中和在文献中有了充分介绍。然而，由于衬底或囊泡溶液中的杂质存在，该过程可导致涂覆不完全。另一个原因也可能是泡囊尺寸过大。融合步骤保温时间太长时，或使用不适合的磷脂组合物时，该过程也导致多层传感器的形成。这些多层传感器就引进了异质性和不稳定性。为了限制和控制在微囊融合的 SPR 监测中这种现象的发生，每次注射磷脂（通常为 1mmol/L，25℃，20min），接着重复注射 20mmol/L 氢氧化钠，以除去不完全囊泡融合导致的磷脂突起。这可以导致 20% SPR 信号上升，并引起主要信号的不稳定。囊泡溶液的制备意味着要反复进行超声波处理，这可能引起磷脂化学降解过程，特别是用镍-亚氨基二乙酸修饰的那些金属解离。在乙酸钠缓冲液中注入 50mmol/L pH 6.0 的氯化镍溶液，用镍重新加载改性脂质（DOGS）双层结构，这是很有用的。这一步，接下来

还需要用注射组氨酸或 EDTA 再生生物芯片。

3. 整个芯片设置的每一步，都必须小心地通过系统的 SPR 测量控制。例如，评价含 10%（mol/mol）DOGS 载体磷脂双层上 Hb5-$(His)_4$ 的连接。强烈推荐一个实验，即当只有 DOPC 或 DMPC 但没有包括修饰脂质时，可以检测出无相互作用，也通过检测验证蛋白质如细胞色素 c 缺乏相互作用，来检测载体层的完整性，通常双层分子的相互作用质量欠佳。

致谢

我们感谢法国巴黎第五大学生物化学和技术实验室的 Marie Agnès Sari 和 Sophie Bombard 对顺铂偶联 P-DNA 复合物的操作和用分光光度计完成的杂交特征检测；法国贝桑松市 LPMO 系弗朗什孔泰热机械和光学-电子科学与技术研究所的 Jean Christophe Zeeh 和 Pierre Emmanuel Puig 对实验的帮助；来自法国波利尼市的国家农业学院的 Didier Dupont 使用 SPR 仪器的帮助；Philippe Urban 在正确使用语言编辑稿件方面的帮助。

参 考 文 献

[1] Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüber, D., Müller, M., Ibrahimi, I., Häuptle, M. T., and Dobberstein, B. (1987) A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo, in *Methods in Enzymology*, vol. 155 (Wu, R. and Grossmann, L., eds.), Academic Press Inc., San Diego, CA, pp. 416–433.

[2] Lepre, C. A. and Lippard, S. J. (1990) Interaction of platinum antitumor com- pounds with DNA. *Nucleic Acids Mol. Biol.* 4, 9–38.

[3] Maxam, A. H. and Gilbert, W. (1980) *Methods Enzymol.* 65, 499–560.

[4] Comess, K. M., Costello, C. E., and Lippard, S. J. (1990) Identification and characterization of a novel linkage isomerization in the reaction of trans- diamminedichloroplatinum(II) with 5'-d(TCTACGCGTTCT). *Biochemistry* 29, 2102–2110.

[5] Boireau, W., Bombard, S., Sari, M. A., and Pompon, D. (2002) Bioengineering and characterization of DNA-protein assemblies floating on supported membranes. *Biotechnol. Bioeng.* 77, 225–231.

[6] Jönsson, U., Fägerstam, L., Ivarsson, B., et al. (1991) Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* 11, 620–627.

[7] Kalb, E., Frey, S., and Tamm, L. K. (1992) Formation of supported planar bilayer by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1103, 307–316.

[8] Stenberg, E., Persson, B., Roos, H., and Urbaniczky, C. (1991) Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J. Colloid Inter. Sci.* 143, 513–526.

[9] Sigal, G. B., Mrksich, M., and Whitesides, G. M. (1997) Using surface plasmon resonance spectroscopy to measure the association of detergent with self-assembled monolayers of hexadecanethiolate on gold. *Langmuir* 13, 2749–2755.

[10] Pierrat, O., Lechat, N., Bourdillon, C., and Laval, J. M. (1997) Electrochemical and surface plasmon resonance characterization of the step-by-step self assembly of a biomimetic structure onto an electrode surface. *Langmuir* 13, 4112–4118.

[11] etryachenko-Ladokhina, V. G., Ladokhin, A. S., Liming, W., Steggles, A. W., and Holloway, P. W. (1993) Amino acid substitutions in the membrane-binding domain of cytochrome b5 alter its membrane-binding properties. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1153, 163–169.

[12] Boireau, W. (1999) PhD thesis, Electrochemistry of cytochrome b5 in solution and reconstituted inside lipidic bilayers. University of Technology, Compièegne, France.

[13] Ng, K., Pack, D.W., Sasaki, D.Y., and Arnold, F.H. (1995) Engineering protein-lipid interactions: targeting of histidine-tagged proteins to metal-chelating lipid monolayers. *Langmuir* 11, 4048–4055.

[14] Lange, C. and Koch, K. W. (1997) Calcium-dependent binding of recoverin to membranes monitored by surface plasmon resonance spectroscopy in real time. *Biochemistry* 36, 12,019–12,026.

[15] Fouchet, M. H., Gauthier, C., Guittet, E., Girault, J. P., Igolen, J., and Chottard, J. C. (1992) Synthesis and characterization of a d(ApG) platined nanonucleotide duplex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 555–560.

第 16 章　生物传感器纳米系统
——蛋白质芯片上的多重免疫分析

Eiichi Tamiya, Zheng-liang Zhi, Yasutaka Morita, Quamrul Hasan

概　　述

本章通过金属粒子随机流体自组装和使用这些阵列作为构建生物分析的蛋白质芯片平台，介绍可寻址二维（2D）芯片的结构。在广阔的应用范围内，这些阵列作为构建生物测定的蛋白质芯片平台非常有用。装配的基本单元是超微型粒子，携带简单的可视代码和在玻璃基底上对应的阵列模板模式。模板一面由疏水性和磁性镍-聚四氟乙烯（Ni-PTFE）组成的粒子复合层；另一面有生物分子附着修饰的金层。我们使用光刻胶模式创建阵列模板，空间离散微孔进入镍-PTFE 疏水复合层和电镀疏水性光敏吸附涂层。生物材料附着和批量结合过程后，粒子在芯片基底上随机自组装到润滑结合位点。这种自组装过程由磁性的、疏水性的和毛细管相互作用组合所驱动。每个粒子携带的编码符号都用于识别附着粒子表面的靶分子。这种模型系统证明蛋白质芯片阵列功效，同时实施人体免疫球蛋白（IgA、IgG 和 IgM）多重免疫分析技术。

关键词：蛋白质芯片；生物芯片；纳米系统；生物传感；微粒阵列；自组装；编码；多重免疫分析技术

16.1　导　　论

液相多重并行检测高通量和物有所值的生物分析系统的制造，严格取决于排列在高度集成的芯片上生物功能分子生物学特征的阵列[1]。一般来说，生物材料附着于生物芯片上的常规技术，包括几种技术的任何一种技术在衬底表面生物成分的直接应用：微接触印迹[2~4]、机器人识别[5~7]和位点选择性光分解沉淀合成[8~10]等技术。然而，这些程序需要尖端的高精度设备，既昂贵又耗时。典型的平面阵列也有几个技术上的缺陷，如结合表面和非均匀大小的阵列特征靶分子缓慢扩散。为了努力克服这些问题，Goodey 等[11]、Christodoulides 等[12]和 Curey 等[13]为流体复合物的多组件并行检测开发了芯片、微腔容纳微珠阵列多功能平台。然而，这个方法需要按顺序将个别珠一次一个放入芯片上的微腔制造阵列。实际上，这种方法极其烦琐，尤其是当应用需要小珠子高密度组装时。Michael 等[14]和 Walt[15]提出了另一种方法，通过在纤维束远端随机分散编码微球，创建随机和高密度的光学生物传感器阵列。这种方法虽然克服了与平面表面技术结合的典型

缺点，但个别微球需要一种光学编码化学，以确定定居在阵列中的每个传感器。

有几篇论文报道聚合酶链反应[16]大规模集成微微升微腔阵列的进展[17]，介绍了适合于微腔 DNA 扩增的新型纳升分配系统[18]，用于构建和开发多功能小型化，多元生物分析元件和构建蛋白质芯片阵列制造编码微结构[19]。

本章介绍构建蛋白质芯片阵列的两步法。第一，生物成分分别固定于微型机械装置和编码微载体上（矩形金属粒子接受雕刻信号）和在大量溶液中与多元靶标特异性结合。第二，在阵列模板上将粒子排列到互补位点上，随后进行检测。制造粒子时，微粒携带的符号编码就引入了简单可视特性。因此，这种方法不需要额外的尖端化学包含编码元素。符号编码用作单个阵列粒子信号和识别附加到每个颗粒表面靶分子/化合物上。

自组装用来排列芯片衬底上的组织结构，从而构建粒子阵列。使用小物体的自组装结构生成高二维阵列结构是生物学、化学和物理学的常用技术[20]。组装组件可以是球状体[21]或非球状体[22~29]，具有大范围的尺度，从几纳米[21]至数毫米[24~29]。到目前为止，自组装技术已经发展成各种实际应用，包括微电子设备元件[24,30,31]、光子带隙结构[32]及其他胶体颗粒三维结构的制造[33,34]。如静电、磁性、疏水和毛细管等各种弱相互作用可以驱动组装[22,23]。为了促进较大物体自组装过程，研究人员代表性地开发了具有润滑作用的毛细管相互作用[22~30]。

这里为了介绍该方法，我们引入疏水和磁性镍-聚四氟乙烯（Ni-PTFE）复合材料层，在两个组装件和阵列模板上的空间分离的微孔相互作用区域。携带固定化生物成分的单个颗粒，然后使其随机装配到阵列模板上，通过组合选择性短程作用力，包括磁性的、疏水性的和毛细管相互作用来改善。此方法结合了典型的基于微球阵列的优点，在阵列的实施和使用中提供了高度的灵活性[15]，以适用于平面芯片阵列询问技术的简单性。所构建的颗粒阵列平台的效用显示，作为用于人免疫球蛋白（IgA、IgG 和 IgM）的同时，还可作为进行多元免疫分析的模型系统[19]。

16.2 材　　料

这里介绍研究需要的负性光刻胶 XP SU- 8 50 显色剂、纳米光刻胶去除剂 PG，以及 XP SU-8 的释放层购自 Microchem 公司（牛顿市，马萨诸塞州，美国）。Supersignal 酶联免疫吸附实验的毫微微最大灵敏度底物获得自 Pierce 公司（罗克福德，伊利诺斯州，美国）。所有的抗体（山羊中开发）、抗原（人 IgA、IgG 和 IgM）及过氧化物酶缀合的抗体购自 Sigma 公司（圣路易斯，密苏里州，美国）并按标准使用。Metaflon FS 镍-PTFE 分散电镀液，含有氨基磺酸镍（Ni^{2+}为 100g/L）加细的 PTFE 颗粒（直径大约 0.2μm；浓度为 50g/L）购自 C. Uyemura & Co 公司（大阪，日本）。16-巯基十六烷酸（90%）获得自 Aldrich 公司（密尔沃基，威斯康星州，美国）。1-十六烷硫醇购自 Wako 公司（大阪，日本）。在这项研究中使用的其他化学品是试剂级的，并从本地商业来源购买。使用图示 9.01（Adobe）进行光掩模设计和使用高分辨率激光打印机系统中的透明胶片打印。

16.3 方 法

16.3.1 光刻模式

清洗玻璃载玻片（38mm×26mm）作为 20nmol 铬蒸发沉积的基底，然后将 200nmol 铜用作导电种子层和后来也作为牺牲释放层。在接触模式下 Karl Suss MJB 3 掩膜调节器，350W 汞紫外线（UV）光源作动力，用于接触光刻。根据制造商提供的说明书（http://www.microchem.com），用大约 2μm XP SU-8 释放层对金属包被基底第一次旋转涂布。接下来，他们是自旋涂上 SU-8 50 光刻胶厚膜的大约 50μm 层，并用标准光刻方法构建。两种抗模式模板法的制备，一个用于颗粒的制备，另一个用于阵列模板（芯片基板）制备；模板制作过程见 16.3.7 节所述。

粒子模板制作，每个井为 48×24 微孔阵列与 400μm×200μm 电化学活性面积，30mm×20mm 基底区域上设计井间分隔空间为 50μm。编码符号位于每个微孔直立区。阵列模板在 20mm×20mm 影响区域，由 21×21 微孔组成结合元件形状和大小。

16.3.2 电沉淀

光刻胶模式衬底用反应离子刻蚀与 O_2 等离子体清洗 2min。这种氧化处理疏水的 SU-8 光刻胶表面，因此亲水性（接触角：<20°）就是粒子对阵列模板上微孔选择性结合的需要。使用 50℃水浴电镀 30min 制备颗粒，在衬底活性区上，用约 $0.1mA/mm^2$ 电流密度制备阵列模板 1h，完成微孔区镍-PTFE 复合层电沉积。用这种方法制备微孔区有平滑、疏水和磁表面，与其他区域比较，还保留亲水性。

16.3.3 粒子制作

随着镍-PTFE（约 6μm 厚）复合层电沉积，用 0.02μm Cr 层和 0.3μm Au 层通过蒸发，模式粒子制备物和阵列模板按顺序沉积到光刻胶顶部。芯片上的金属化抗性模式，在 SU-8 去除剂 PG 溶液中 80℃浸泡 10～20min 后取出。通过用含有次氯酸钠（0.2mol/L）、氨（0.7mol/L）、碳酸铵（2.6mol/L）的蚀刻液溶解铜层，使基础衬底的粒子获得解放。将颗粒转移并存储在添加有乙醇的 Eppendorf 离心管中。当用磁铁接近含有颗粒悬浮液的管时，它们显示出瞬时吸力，从而证实它们的磁特性。

16.3.4 IgA、IgG 和 IgM 在粒子上的免疫分析

在乙醇中含 1mmol/L 16-巯基十六烷酸溶液浸泡 24h，所制造的颗粒包被成自组装单层（SAM）。携带羧基端的粒子用乙醇洗涤，并转移到 0.5ml Eppendorf 离心管中。然后

用 100μl 含有 2μg/ml 抗 IgA、IgG、IgM 任何一种抗体，或 2%的酪蛋白（作为阴性对照），在 50mmol/L 磷酸盐缓冲液（PBS）与 138mmol/L 氯化钠（pH 7.4），室温下搅拌 3h 处理四套粒子。随后用 2%的酪蛋白（钠盐）钝化 1h，以防止后续步骤中蛋白质的非特异性吸附。最后，用 10mmol/L 的 PBS（pH 7.4）中含有 0.01% Tween-20 将这些颗粒漂洗 3 次。

每套含 10～20 个具有固定化单个抗体的粒子，于 0.5ml 的 Eppendorf 离心管中组合。加入 100μl 含有 IgA、IgG 和 IgM 混合物的样品并孵育 1h。随后将颗粒漂洗，再加入 100μl 三偶联过氧化物酶报道抗体混合物（每份有 4μg/ml 浓度），以便在粒子上形成夹心免疫结合复合物 1h 并清洗。然后将免疫处理的颗粒加到阵列模板上，最后检测，如在 16.3.5 节和 16.3.6 节所介绍的一样。

为了达到校准目的，对 0.001～10μg/ml 六个标准浓缩抗原分别进行测试，每个对应一套粒子。在单个实验中也使用几个标准抗原进行校准。在这种情况下，首先在分离管中将三套粒子与同样抗体进行固定化，在分离管中封闭；然后将含有 3 种不同浓度分析物的标准，分别加入到该颗粒并孵育。将颗粒洗涤并合并，加入过氧化物酶偶联报道抗体而形成夹心免疫结合复合物。

16.3.5　粒子阵列的组装

在微孔表面上拥有电沉积镍-PTFE 层的，SU-8 光刻剂模式阵列模板用永久磁铁磁化 2h。然后将模板包被 16-十六烷基硫醇 SAM 12～24h，并按 Srinivasan 等[30]介绍的方法，用疏水光固化黏合剂薄膜润滑。光固化胶黏剂由 96∶2∶2（*m*/*m*/*m*）烷基甲基丙烯酸十二酯/苯偶姻异丁基醚/1,6-己二醇二丙烯酸酯组成[22,23]。用蒸馏水冲洗后，将芯片转移到 100ml 的容器中；借助泵维持芯片表面不断的水流（含 0.1mol/L 氯化钠）。然后用巴斯德吸管慢慢地加入粒子，并固定到芯片基板表面。将该片横向表面移动，最后定居微孔位点上，用光固化胶黏剂层覆盖，形成粒子阵列。暴露于紫外线辐射（100W）20min 后，将片子固定到位。没有与微孔结合的过剩粒子经清洗而去除。

16.3.6　化学发光信号的测定

位于衬底多组分粒子点的化学发光信号通过 MZFLⅢ显微镜放大和用电荷耦合器相机探测器成像。然后采用 IPLab 谱 P 软件分析图像。来自显微镜粒子区的化学发光信号用 30s 采集时间捕获。

为了启动发光反应，将鲁米诺和 H_2O_2 组成的 0.1ml 化学发光混合物吸到粒子-定居的衬底上。通过免疫结合，将过氧化物酶标记抗体固定到粒子表面，从而发射化学发光信号。通过阅读位于衬底发出的颗粒编码信号，我们能够确定结合到单个粒子上的靶分子。

16.3.7　蛋白质芯片衬底粒子阵列的制备和装配

微细加工技术应用于制备编码多层粒子和对应阵列模板。首先，这些技术包括光刻技术、剥离掩模电镀[35]、金属热蒸发和湿法蚀刻。芯片基底上的粒子和阵列模板制作的典型过程如图 16.1 所示。

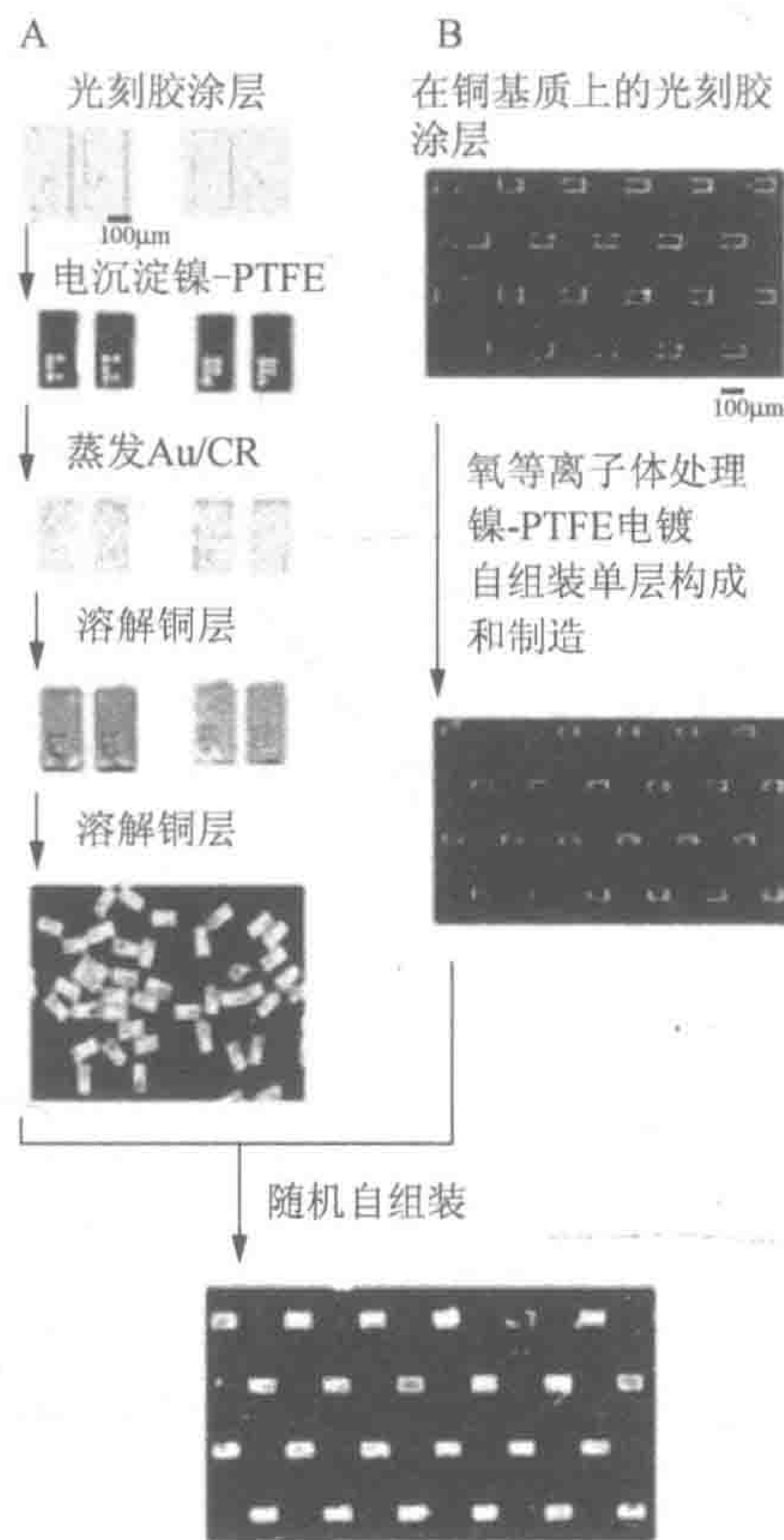


图 16.1　蛋白质芯片基板上构建及自组装粒子阵列使用的方案。(A) 编码的层颗粒的制备。SU-8 50 光刻胶模式作为铜镀膜玻璃衬底上模板，并镍-PTFE 层（约 6μm 厚）电沉积到微孔开放区。铬（20nm）和金（300nm）在整个芯片表面蒸发后，用 SU-8 去除剂 PG 溶液使金属化的 SU-8 光刻胶剥离。最后，通过溶解铜牺牲层使粒子从基础基板中释放出来。这里只显示两种类型的编码粒子的例子。(B) 在芯片基板上微孔阵列模板的制备。在铜覆盖的玻片上的 SU-8 光刻胶（约 50μm 厚）模式微孔阵列用 O_2 等离子体和镍-PTFE 层（约 6μm 厚）处理，电沉积到微孔开放区上。然后用永久磁铁磁化疏水镍-PTFE 结构并用光固化黏合剂薄膜通过疏水相互作用将其进一步涂层。芯片基板接下来浸入流体水系统中，并且慢慢地加入颗粒悬浮液完成自组装过程。最后，暴露于紫外线辐射固化胶黏剂，从而提供可用于检测的机械稳定粒子阵列（彩图请扫封底二维码）

为了制作芯片模板，将基底表面模仿制成定义的疏水性（微孔）和亲水性表面区域（剩余区域）。发现，光刻模式抗蚀剂层氧等离子体刻蚀，呈现表面亲水。然后，阵列模板上微孔区域的电沉淀镍-PTFE 层（约 6μm 厚）使这些区域疏水。这些区域用 16-十六烷基硫醇 SAM 进一步包被，微孔表面呈现出超疏水性。随着这一进程，衬底上的微孔区域成为疏水性(也是磁性的)，而其他区域保持亲水性，因而进一步促进了疏水性、光固定胶黏剂薄层在微孔区域的包被。

基于磁性、疏水性和毛细管相互作用的组合，图 16.2 说明自组装过程的基本原理。

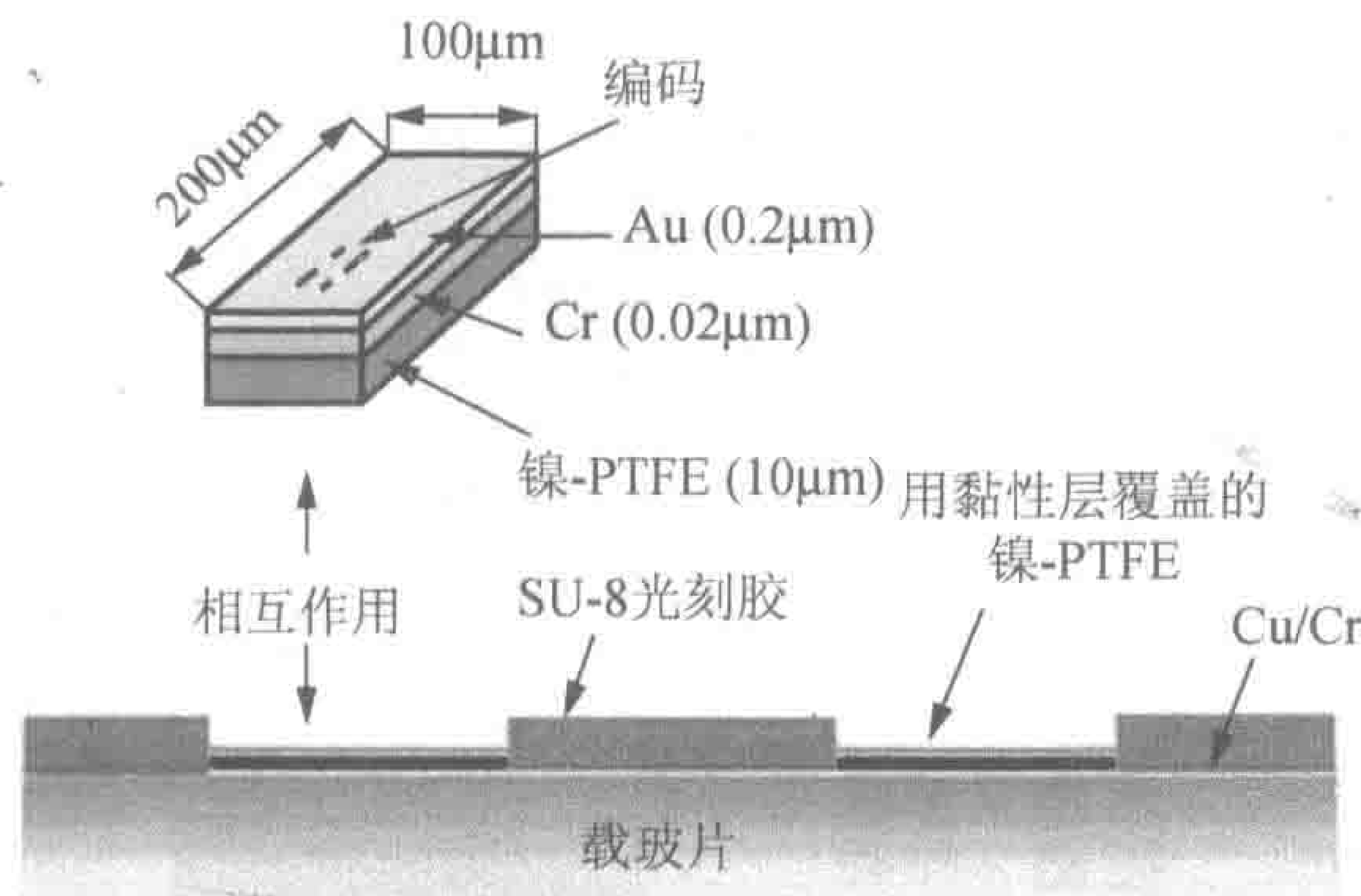


图 16.2　蛋白质芯片基板上编码粒子与微孔阵列模板表面相互作用的示意图

16.3.8　多重免疫分析步骤概述

现行方法多重能力的实验，验证了人免疫球蛋白（IgA、IgG 和 IgM）三个独立分析的平行测定。三明治免疫检测模式，使用拥有固定化的抗体、过氧化物酶标记的报道抗体的颗粒和基于鲁米诺化学发光检测系统。用 16-巯基十六烷基酸钝化后，金的颗粒表面就容易与生物分子耦合化学（通过吸附）和基于发光检测技术相兼容[35]。基于粒子多重免疫分析的典型方案如图 16.3 所示。

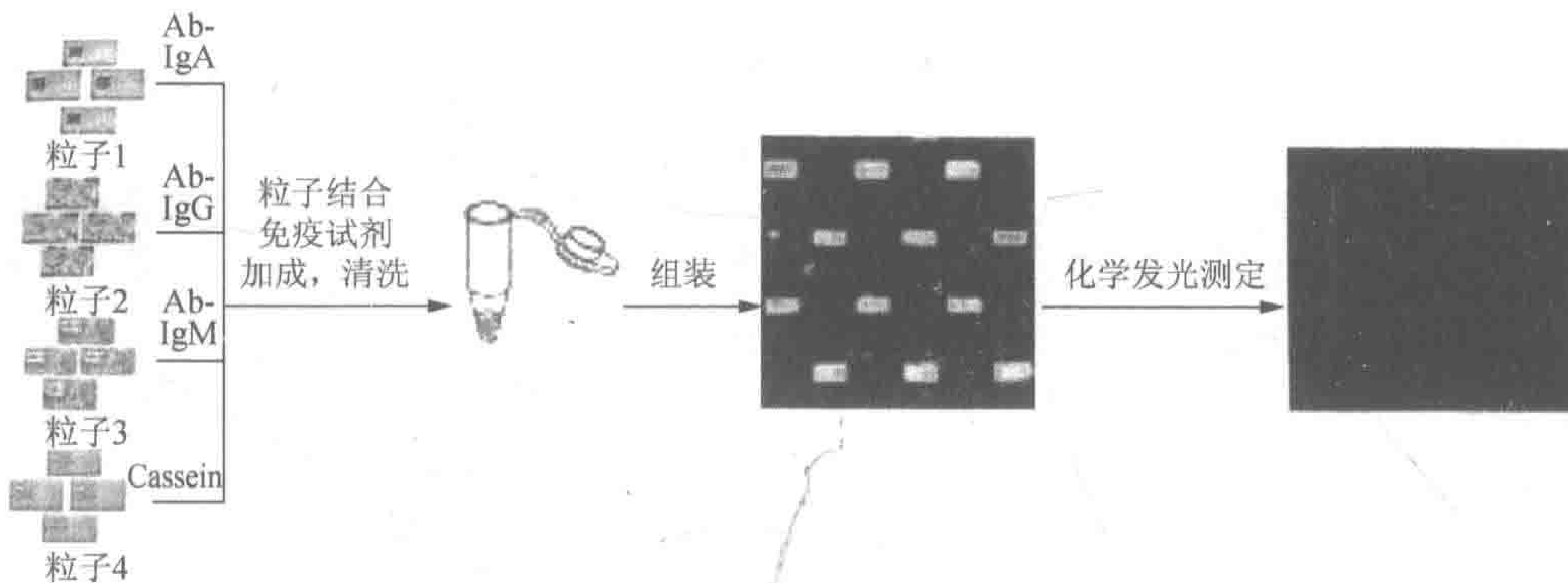


图 16.3　用蛋白质芯片衬底上阵列颗粒平行引导多重免疫分析的步骤。承受识别码的粒子独立子集，每一个均被特异性抗体标记。将组合固定到塑料管后，依次添加夹心法免疫试剂，然后粒子以随机方式装配到芯片模板上。鉴定单个粒子记录的编码信号，随后检测每个定居衬底上的靶分子

借助于集成粒子光强度 3 倍平均值对抗原浓度值分别获得 3 种抗原的校准曲线，如图 16.4 所示。

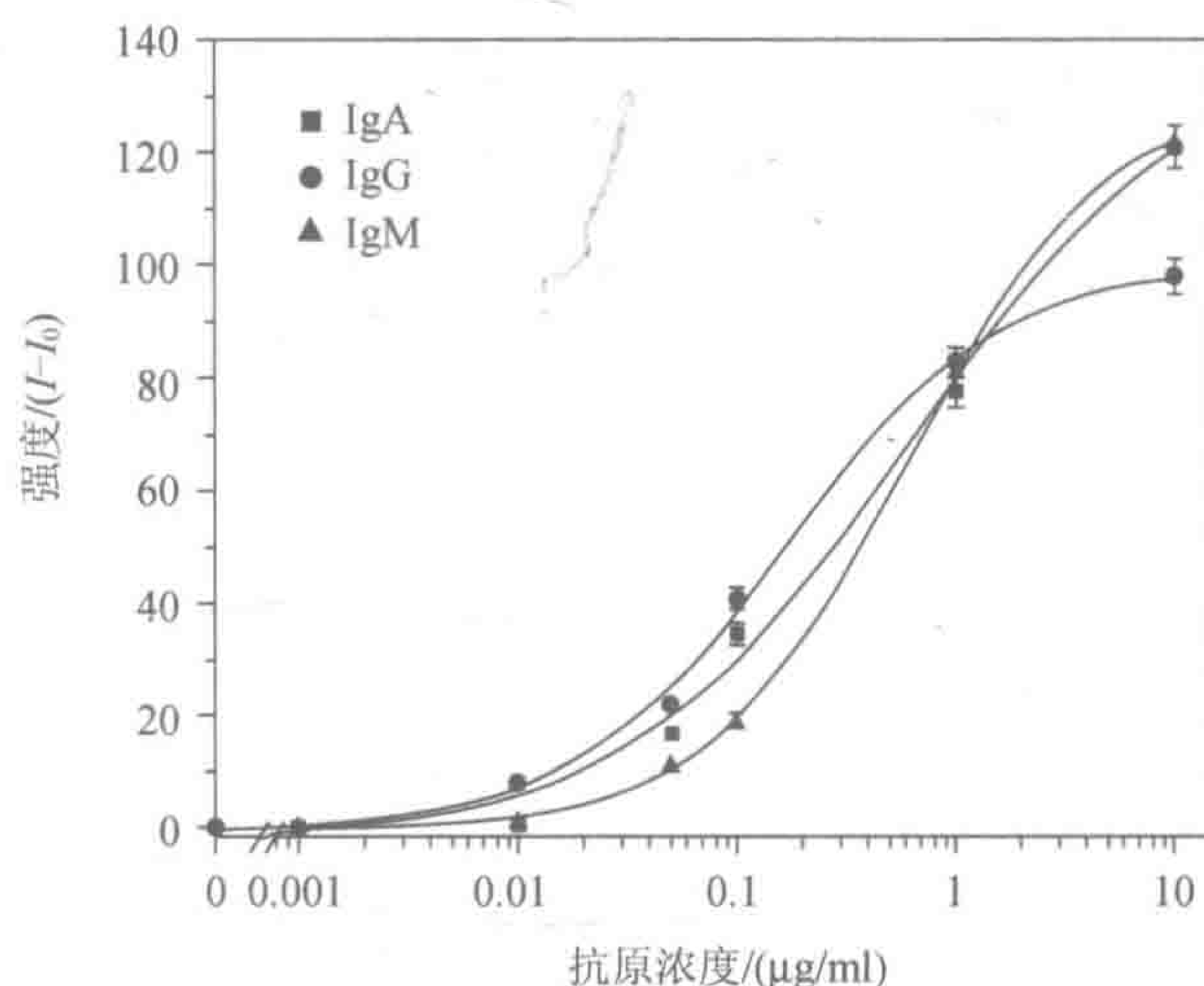


图 16.4　微型制备粒子上发光检测 IgA、IgG 和 IgM 多元免疫化学分析的校准曲线。单个粒子衍生的强度数据减去背景值

所有该曲线都显示非线性函数结合行为。IgA、IgG 和 IgM 的测定范围通常是 10ng/ml 到 1μg/ml，检出极限大约 10ng/ml。这项工作中获得的检测极限，主要依赖抗体和抗原的亲和性，就像出现于传统免疫检测方法一样。

做定量分析必须用单一芯片上的几个标准进行校准。为了实现这一目标，实验性方案需稍加修改：首先不同套的粒子与相同的抗体固定化并在单独的管中封闭；含一定浓度的分析物的标准逐个添加粒子并孵化。随后加入偶联过氧化物酶报道抗体，形成三明治免疫结合复合物。采用微细加工技术制备粒子的程序服从于低成本大批量生产，因此适用于推广到实验室以外的应用。

16.4　结　　论

这一章概述了随机排序的模板定向自组装、可用于微型化多重免疫分析的可寻址粒子阵列。本章介绍的方法，为组合模式中平行生物测定提供多功能构建元件。这个方法的优点包括改善测定操作中的灵活性和在检测过程中避免重叠，或避免邻近微粒之间的聚集。此外，在单个操作中涉及的每一种粒子和对照颗粒多重拷贝，通过信号平均改善精确度，同时通过错误结果概率最小化，减少单个传感器用于分析可能出现的（正或负）错误结果。由于独特的制造工艺和潜在的高水平编码能力，通过该方法制备的粒子一旦阵列装配效率被优化——就可以广泛地应用于基因组学、蛋白质组学、组合化学和其他高通量生物筛选和生物分析中。

致谢

我们感谢 R. B. DiGiovanni 和 J. A. Steeh 教授编辑援助。本工作得到了日本文部省奖学金科学研究优先区、日本学术振兴会未来研究项目、北陆先端科学技术大学院大学 21 世纪卓越中心项目的部分资助。

参考文献

[1] Sanders, G. H. W. and Manz, A. (2000) Chip-based microsystems for genomic and proteomic analysis. *Trends Anal. Chem.* 19, 364–378.

[2] Jackman, R. J., Wilbur, J. L., and Whitesides, G. M. (1995) Fabrication of submicrometer features on curved substrates by microcontact printing. *Science* 269, 664–666.

[3] Bernard, A., Fitzli, D., Sonderegger, P., Delamarche, E., Michel, B., Bosshard, H.R., and Biebuyck, H. (2001) Affinity capture of proteins from solution and their dissociation by contact printing. *Nat. Biotechnol.* 19, 866–869.

[4] Okamoto, T., Suzuki, T., and Yamamoto, N. (2000) Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology. *Nat. Biotechnol.* 18, 438–441.

[5] MacBeath, G.M. and Schreiber, S.L. (2000) Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 289, 1760–1763.

[6] Wiese, R., Belosludtsev, Y., Powdrill, T., Thompson, P., and Hogan, M. (2001) Simultaneous multianalyte ELISA performed on a microarray platform. *Clin. Chem.* 47, 1451–1457.

[7] Lee,K.B.,Park,S.J.,Mirkin,C.A.,Smith,J.C.,andMrksich,M.(2002)Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography. *Science* 295, 1702–1705.

[8] Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467–470.

[9] Fodor, S. P. A., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T., and Solas, D. (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251, 767–773.

[10] Fodor, S. P. A., Rava, R. P., Huang, X. C., Pease, A. C., Holmes, C. P., and Adams, C. L. (1993) Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* 364, 555, 556.

[11] Goodey, A., Lavigne, J. J., Savoy, S. M., et al. (2001) Development of multi-analyte sensor arrays composed of chemically derivatized polymeric microspheres localized in micromachined cavities. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 2559–2570.

[12] Christodoulides, N., Tran, M., Floriano, P. N., Rodriguez, M., Goodey, A., Ali, M., Neikirk, D., and McDevitt, J. T. (2002) A microchip-based multianalyte assay system for the assessment of cardiac risk. *Anal. Chem.* 74, 3030–3036.

[13] Curey, T. E., Salazar, M. A., Oliveira, P., Javier, J., Dennis, P. J., Rao, P., and Shear, J. B. (2002) Enzyme-based sensor arrays for rapid characterization of complex disaccharide solutions. *Anal. Biochem.* 303, 42–48.

[14] Michael, K. L., Taylor, L. C., Schultz, S. L., and Walt, D. R. (1998) Randomly ordered addressable high-density optical sensor arrays. *Anal. Chem.* 70, 1242–1248.

[15] Walt, D. R. (2000) Bead-based fiber-optic arrays. *Science* 287, 451, 452.

[16] Nagai, H., Murakami, Y., Morita, Y. Yokoyama, K., and Tamiya, E. (2001) Development of a microchamber array for picoliter PCR. *Anal. Chem.* 73, 1043–1047.

[17] Matsubara, Y., Kobayashi, M., Morita, Y., and Tamiya, E. (2002) Application of a microchamber array for DNA amplification using a novel dispensing method. *Arch. Histol. Cytol.* 65(5), 481–488.

[18] Zhi, Z. L., Morita, Y., Hasan, Q., and Tamiya, E. (2003) Micromachining microcarrier-based biomolecular encoding for miniaturized and multiplexed immunoassay. *Anal. Chem.* 75, 4125–4131.

[19] Zhi, Z. L., Murakami, Y., Morita, Y., Hasan, Q., and Tamiya, E. (2003) Multianalyte immunoassay with self-assembled addressable microparticle array on a chip. *Anal. Biochem.* 318, 236–243.

[20] Whitesides, G.M. and Grzybowski, B. (2002) Self-assembly at allscales. *Science* 295, 2418–2421.

[21] Boal, A. K., Ilhan, F., DeRouchey, J. E., Thurn-Albrecht, T., Russell, T. P., and Rotello, V. M. (2000) Self-assembly of nanoparticles into structured spherical and network aggregates. *Nature* 404, 746–748.

[22] Clark, T. D., Tien, J., Duffy, D. C., Paul, K. E., and Whitesides, G. M. (2001) Self-assembly of 10-μm-sized objects into ordered three-dimensional arrays. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 7677–7682.

[23] Clark, T. D., Ferrigno, R., Tien, J., Paul, K. E., and Whitesides, G. M. (2002) Template-directed self-assembly of 10-μm-sized hexagonal plates. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 5419–5426.

[24] Gracias, D. H., Tien, J., Breen, T. L., Hsu, C., and Whitesides, G. M. (2000) Forming electrical networks in three dimensions by self-assembly. *Science* 289, 1170–1172.

[25] Terfort, A., Bowden, N., and Whitesides, G. M. (1997) Three-dimensional self-assembly of millimetre-scale components. *Nature* 386, 162–164.

[26] Grzybowski, B. A., Stone, H. A., and Whitesides, G. M. (2000) Dynamic self-assembly of magnetized, millimeter-sized objects rotating at a liquid-air inter- face. *Nature* 405, 1033–1036.

[27] Tien, J., Breen, T. L., and Whitesides, G. M. (1998) Crystallization of millimeter-scale objects with use of capillary forces. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 12,670–12,671.

[28] Breen, T. J., Tien, J., Oliver, S. R. J., Hadzic, T., and Whitesides, G. M. (1999) Design and self-assembly of open, regular, 3D mesostructures. *Science* 284, 948–951.

[29] Oliver, S. R. J., Clark, T. D., Bowden, N., and Whitesides, G. M. (2001) Three-dimensional self-assembly of complex, millimeter-scale structures through capillary bonding. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 8119, 8120.

[30] Srinivasan, U., Liepmann, D., and Howe, R.T. (2001) Micro structure to substrate self-assembly using capillary forces. *J. Microelectromech. Syst.* 10, 17–24.

[31] Gittins, D. I., Bethell, D., Schirin, D. J., and Nichols, R. J. (2000) A nano-meterscale electronic switch consisting of a metal cluster and redox-addressable groups. *Nature* 408, 67–69.

[32] Joannopoulos, J. D. (2001) Self-assembly lights up. *Nature* 414, 257, 258.

[33] Li, M., Schnablegger, H., and Mann, S. (1999) Coupled synthesis and self-assembly of nanoparticles to give structures with controlled organization. *Nature* 402, 393–395.

[34] Cheng, Z., Russel, W. B., and Chaikin, P. M. (1999) Controlled growth of hardsphere colloidal crystals. *Nature* 401, 893–895.

[35] Nicewarner-Pena, S. R., Freeman, R. G., Reiss, B.D., He, L., Pena, D. J., Walton, I. D., Cromer, R., Keating, C. D., and Natan, M. J. (2001) Submicrometer metallic barcodes. *Science* 294, 137–141.

第 17 章　检测单个活细胞中蛋白质和生物标记物的光学纳米传感器

Tuan Vo-Dinh

概　　述

近年来，纳米技术已经成为彻底变革分子生物学和医学，特别是在分子和细胞水平诊断和治疗的重要领域。结合纳米技术、生物学、先进材料、光子学开创了用纳米仪器探测和操纵原子和分子的可能性。这种能力在细胞水平上具有潜在的广而多样的医疗用途。最新的技术进展之一是在纳米传感器领域获得的。这一章介绍光学纳米传感器的原理，它们的进展，在单个活细胞中蛋白质、生物标记物的体内分析及其应用。用远末端拉成纳米级维度尖头的光纤制备纳米传感器。纳米传感器拥有对靶分析物分子有选择性的、固定化的生物受体（如抗体、酶底物）探针，也称为纳米生物传感器。将激光发射到纤维，纤维尖头产生的倏逝场用于激发靶分子与抗体分子键合。光度计检测系统用于检测来自分析物分子或分析物生物受体反应的光信号（如荧光）。

关键词： 纳米传感器；纳米探针；纳米技术；生物传感器；抗体；单细胞；呋喃苯并芘；癌症

17.1　导　　论

由于细胞对外界刺激的群体异步应答，单个活细胞内蛋白质和相关细胞信号转导途径微创分析变得越来越重要。有必要进一步加深对基础细胞信号转导过程的理解，以便获得在群体平均细胞检测难以获得的新信息。活细胞分析的进一步优势，是它能让我们了解通过细胞结构移动的信号转导确切通路。不仅有必要解决此类现实的测量问题；而且有必要解决它们时空的问题。出于这些原因，细胞生理学需要继续发展能应用于单细胞蛋白质测量，具有很大的时间和空间分辨率的新战略。

为了阐明分子水平上发生的，迄今为止人们肉眼看不到的生命起源过程，探测细胞机制，纳米技术和光子学的研究进展最近导致了新一代设备的诞生[1]。纳米技术的最新进展已导致具有纳米级维度的纳米传感器设备的开发，这样的尺度，使它们适合探测生物分子如单细胞内蛋白质。这些纳米工具可以提供新的信息，大大改善我们对细胞功能的理解，因而对细胞生物学将产生革命性变化。

光纤传感器为远程的原位监测提供了有用的工具。纳米光纤传感器适用于遥感细胞

内/细胞间微环境中的生理学和生物学参数。种类繁多的光纤化学传感器和生物传感器，已在我们的实验室用于环境和生化监测[2~9]，开发了超微纤维用于近场光学研究[10,11]。用具有直径 20～500nm 的亚微型锥形光纤开发了近场扫描光学显微镜（NSOM），NSOM 能够实现波长 100nm 分辨率的拉曼光谱的检测[12,13]。Tan 等[14,15]开发和使用化学纳米传感器完成了单细胞中钙和氧化氮及其他生理化学的测定。Vo Dinh 等已经开发了抗体探针[24]和基于酶底物的纳米传感器[16~23]，用于检测活单细胞内生化靶分子和蛋白质。本章介绍操作原理、仪器、方案和纳米光学传感器的应用。

17.2　生物传感器和纳米传感器的原理

17.2.1　近场光学和纳米传感器

最初开发用于近场扫描光学显微镜的纳米纤维是包括光源或比光波长小的探测器技术[10]。为完成这些实验开发的第一种方法是在探测器前面放置针孔，从而有效地减少探测器尺寸。这些针孔在后来的变化中，一种比光波小的维度激发探针应用于样品检测。Betzig 和 Chichester [11]开发了一种这样的探头，能获得约 12nm 空间分辨率的测量能力。用微管拉制仪将单模光纤拉制成直径 20nm 的尖头，然后用 100nm 铝涂层纤维壁，尖头定义激发辐射。用这种纳米探针即在照明模式中完成光栅扫描重构图像模式，作为探针工作的局部光源。

近场显微镜激起了人们极大的兴趣，因为它有极高的空间分辨率（亚波长）[10]。例如，最新的方法称为近场表面增强拉曼光谱（NF-SERS）已用于单一染料和染料标记 DNA 分子的检测，分辨率为 100nm [12,13]。在这项工作中发现，用发光染料甲酚蓝标记的 DNA 链定位于表面增强拉曼散射活性基底上，这种基底通过在纳米粒子包被基底上的银蒸发而制得。银包被纳米结构基底，能诱导表面增强拉曼散射效应，可以增强吸附分子的拉曼信号达到 10^8 倍[25]。通过纳米探针照射样品，收集近场表面增强拉曼散射光谱和使用装有电荷耦合器（CCD）光谱仪，检测表面增强拉曼散射信号。光栅扫描样品上面的光纤探针和规范表面形态，用于瑞利散射光产生在基底表面上 DNA 的二维（2D）表面增强拉曼光谱图像与亚波长分辨率。为监测单细胞甚至生物分子提供成像工具的近场光学显微镜是正在成长的研究领域。使用纳米纤维进行单分子检测和成像方案，将为复杂生化反应、生物学通路和细胞系统的研究开创新的途径。

17.2.2　生物传感器组件

这些年来，新的生物传感技术为生物学研究领域巨大进展奠定了基础。生物传感器的两个基本工作原理是生物识别和传感。因此，传感器一般可以定义为一种仪器，该仪器由两个基本构件串联组成：①生物识别元件，通常称为生物受体；②变频器[4,18]。生物传感器检测分子并用变频器将这种识别转化为另一类型的信号。设计被测物与生物受

体的相互作用由变频器产生一种有效测定，变频器将信息转换成可测定效应，如电子信号。生物受体是一种生物分子（如抗体、酶、蛋白质或核酸）或是采用生化机制进行识别的活生物系统（如细胞、组织或整个生物体)。识别系统的主要目的是为传感器提供对被测分析物具有高度的选择性。

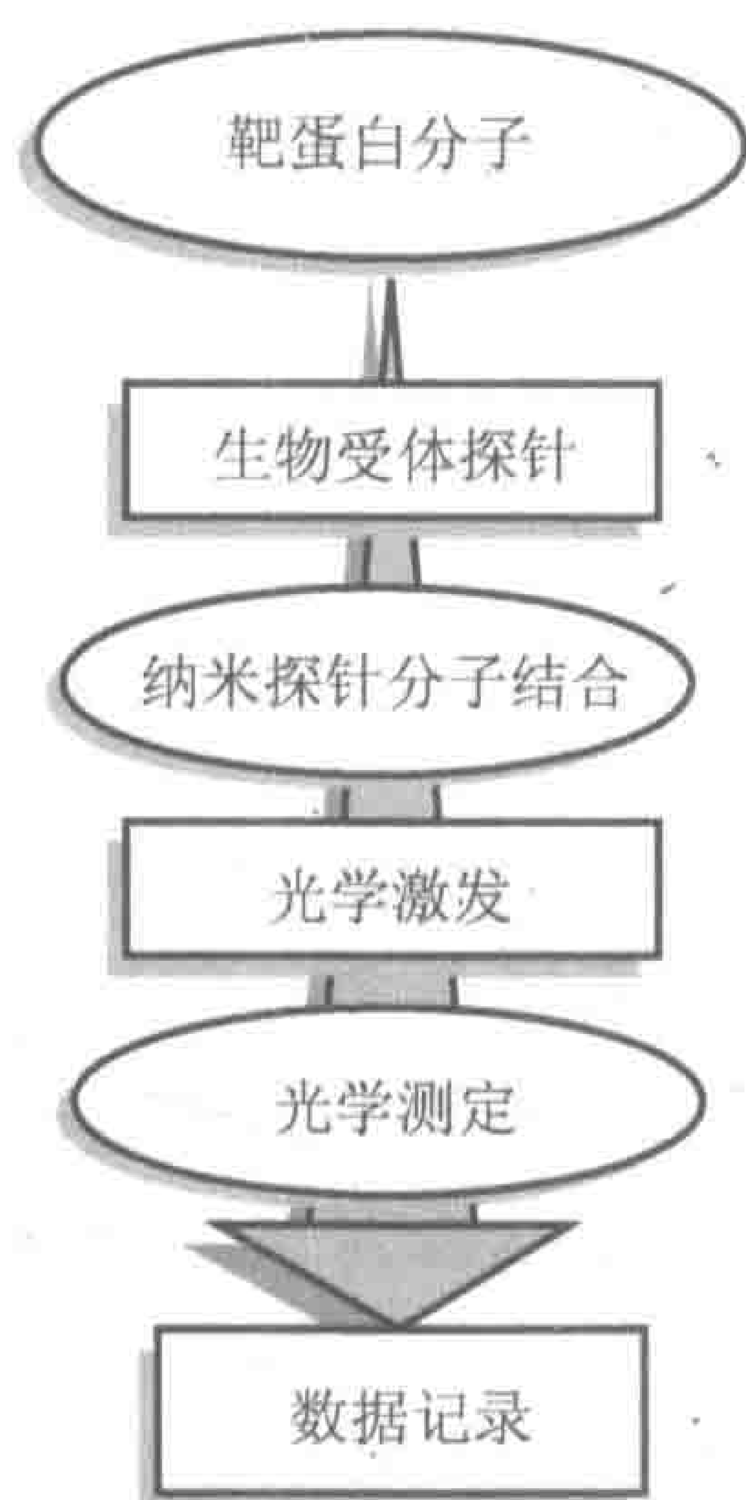


图 17.1　生物传感器系统原理

用于生物传感器有几种变频方法，主要包括基于光学检测、电化学检测和基于质量检测等 3 种主要方法，其他检测方法包括电流和磁场法。新类型的生物传感变频器还在不断地开发出来。3 种主要方法中每种方法又包含许多不同的亚类，正在创建一大批可能变频方法或重组方法。这一章重点研究光学变频方法。如图 17.1 所示，生物受体探针和光学检测生物传感过程的概念性原理。

纳米技术导致的亚微型光学纤维开发的最新进展，为细胞内测定开阔了新的视野。通常情况下，用于这些传感器的光纤检测探头，直径为 20～100nm。这些传感器是基于相同的基本原理，作为更常规的光学生物传感器，除了激发过程外。由于光纤探测头的直径明显小于用于分析物激发光的波长，光子就不能逃脱纤维探测头而被目的物吸收，正如较大的光纤传感器情况一样。相反，在光纤纳米传感器中，光子旅行尽可能远的纤维后，激发子或倏逝场继续穿越探测头的剩余部分，为存在于生物传感层中的目的荧光物质提供激发能量。倏逝激发附加特征是唯一非常接近激发的纤维纳米探针的物质，从而排除样品以外荧光物干扰的激发。因此，收集的任何信号都是来自非常接近（100nm 近场环境内）纤维的分子。这种特征使定位达到前所未有的水平。

17.2.3　生物受体

特异性生物传感器技术的关键在于使用生物受体分子。生物受体负责目的分析物与传感器结合的测量。可以采用多种形式生物受体，就像生物传感器监测不同被检测物的量一样多。然而，生物受体通常分为 5 个主要类别：抗体/抗原、酶、核酸/DNA、细胞结构/细胞和仿生学。本章涉及抗体探针的生物传感器系统，通常被称为免疫传感器，即具有光学检测的传感器系统。17.4 节讨论涉及酶底物的另一种类型探针。

免疫反应包括抗原抗体结合反应，为特异性免疫分析提供依据。抗体是一种复杂的生物分子，由数百个单个氨基酸高度有序排列组成。当这些细胞与物质或称为抗原分子接触时，免疫系统细胞就产生抗体。随着与抗原进一步接触，抗体设别或与抗原特异性分子的结构（或亚结构）位点结合。抗原和抗原特异性抗体相互作用方式类似于锁和钥匙，其中唯一的关键特异性构造使它能够打开锁。同样的方式，一种抗原特异性抗体与它的唯一抗原以高度特异性的方式相配，以便抗原和抗体分子三维（3D）结构互补。由于这种三维形状拟合和个别抗体组成的多样性，可能找到一种抗体，可以识别并与任何一种不同形状大型分子结合。

这种独特属性的抗体是免疫传感器的关键；他们能够识别分子结构的能力使人们开发与化学药物、生物分子、微生物组分等特异性结合的抗体。然后可以使用这种抗体，作为特异性探针识别并在大量的其他化合物中，与存在的甚至极其小量的分析物结合。由于首次开发了微小光纤免疫传感器，原位检测化学致癌物质苯并[a]芘（BaP）[2]，抗体已成为常用生物传感器中的生物受体。

17.3　材料和方法

17.3.1　光纤纳米探针的制作

本节介绍用于制作光纤纳米探针的方案和仪器。由于光纤探针不适合做成商品供用，因此研究者必须在实验室自己制备它们。通常使用两种方法制备纳米纤维探头。所谓热拉方法是最常用的。此方法利用激光对玻璃光纤局部加热，或用长丝和随后将纤维拉制进行。得到的纳米纤维探头形状取决于可控实验操作参数如温度和时间程序。第二种方法通常称为特纳（Turner）方法，包括玻璃的纤维化学刻蚀。在各种标准的蚀刻方案中，聚合物包被的玻璃光纤内形成锥形。

使用热拉程序，我们实验室制备纳米纤维的实验步骤示意，如图 17.2 所示[21]。热拉过程使用特殊纤维拉制设备（萨特仪 P-2000），将大的石英光纤拉成圆锥探头纤维。这种方法产生亚微型直径纤维。超级纤维抛光机将 600μm 硅/硅纤维一端抛光成 0.3μm。然后纤维拉拔器将光纤的另一端拉成亚微米级长度。研究制备的光纤探针之一的扫描电镜照片如图 17.3 所示。远端的纳米纤维约为 30nm。

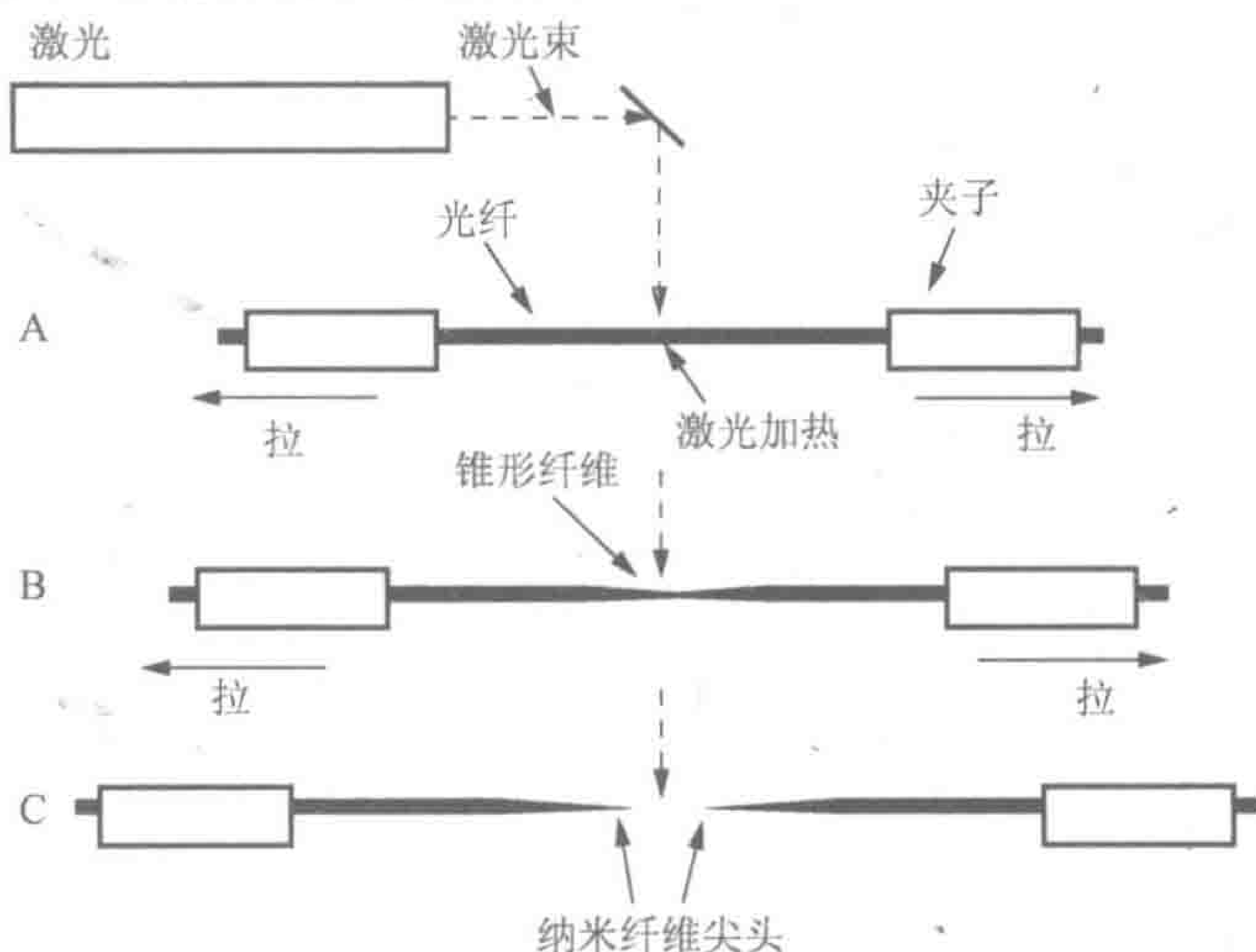


图 17.2　用热拉技术制备纳米纤维

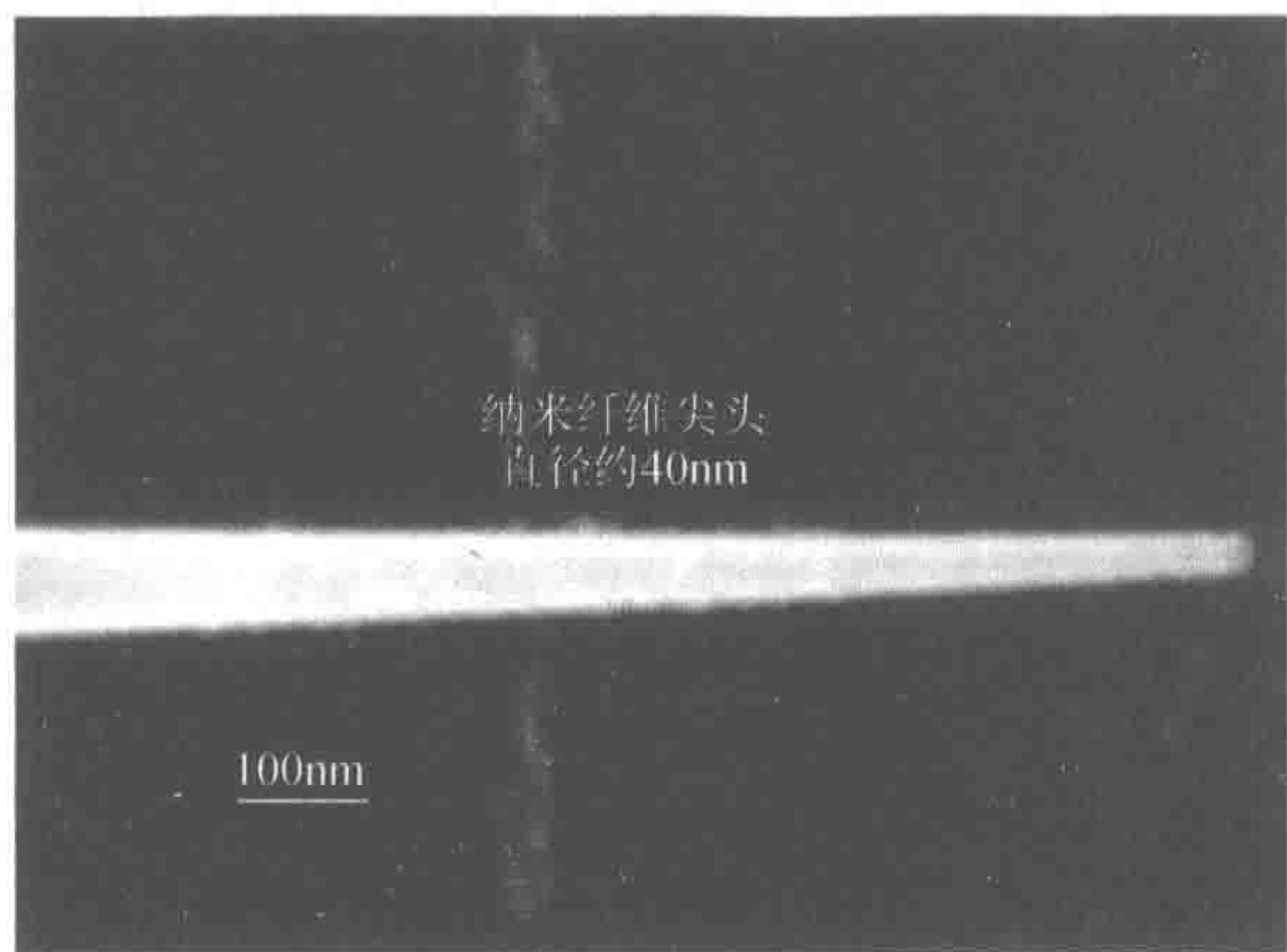


图 17.3　非涂层纳米探针的扫描电子显微照片。纤维探头直径约为 40nm

为了防止纤维锥形一边激发光的泄漏，用热蒸发仪器将锥状顶端的侧壁再包被薄薄一层（100nm 厚）金属，如银、铝或金。涂层程序示意图如图 17.4 所示[21]。金属镀层仅供没有与生物受体结合物的游离纤维侧壁和远端。光纤探针与热蒸发室的旋转板相连[4,19,21]。纤维轴和蒸发方向形成约 45°角。同时在探针旋转时，允许金属蒸发到光纤探头圆锥侧面形成一层薄薄的包被。用 10^{-6} 托的热源在 Cooke Vacuum 蒸发器系统中将锥状末端包被 300～400nm 的银。由于光纤探头尖朝远离金属源，因此它仍然是没有任何金属包被。拥有金属包被的探针探头尖大小为 250～300nm（图 17.5）。

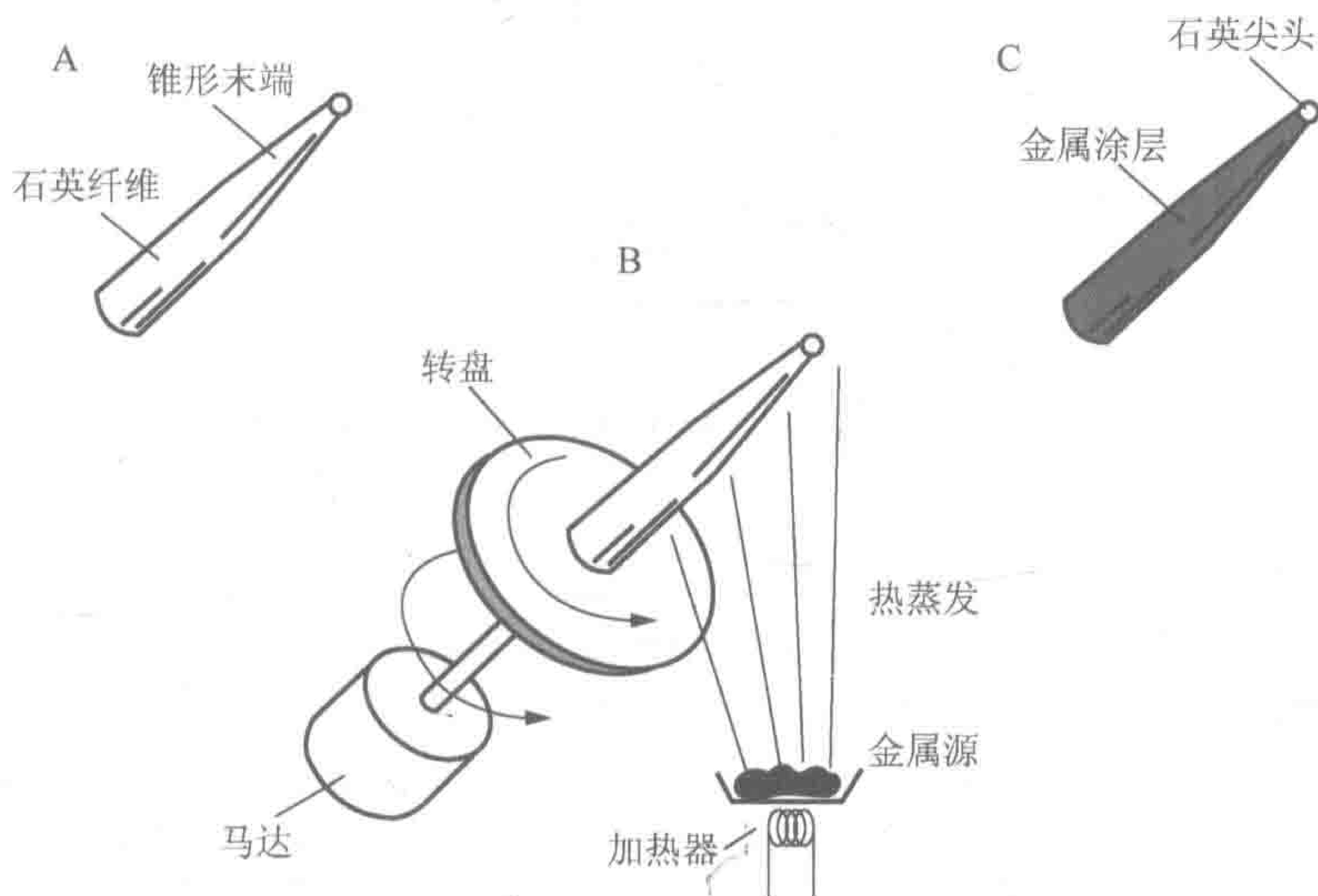


图 17.4　用银涂层纳米纤维的方案。（A）未涂层纤维探头；（B）用金属蒸发方法在探头上涂层的纤维；（C）涂层纤维

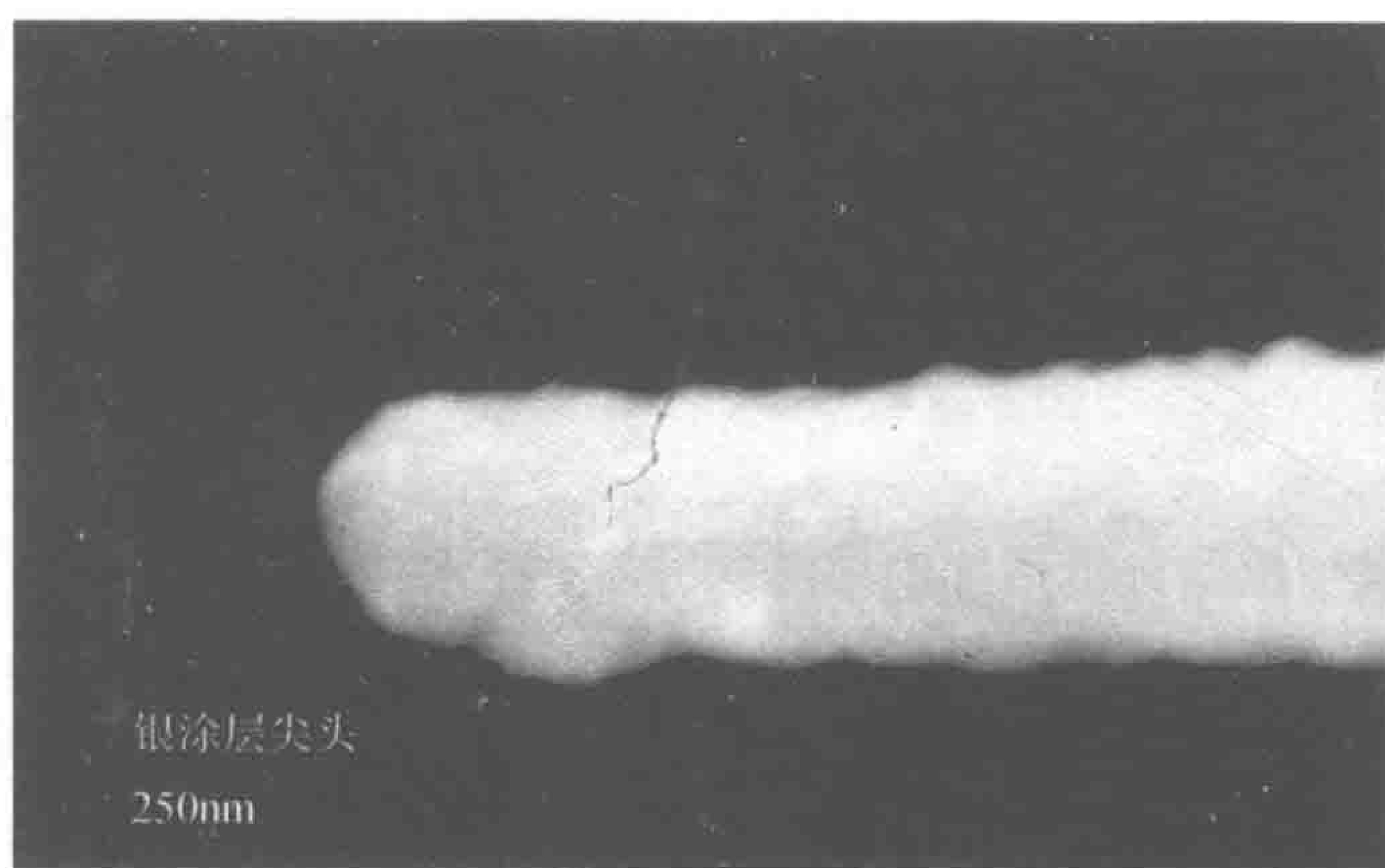


图 17.5　用银包被侧壁的光纤纳米传感器扫描电子显微照片

制备光学纤维的另一种方法涉及氟化氢化学蚀刻。有两种不同的氟化氢刻蚀方法：一种方法是使用氟化氢酸与有机溶剂混合物，称为特纳蚀刻[26]；另一种方法只有氟化氢，称为管蚀刻[27~29]。在特纳方法中，纤维位于氟化氢与有机层之间的半月层上，经过一段时间，就形成平滑、大的、成圆锥角度的小尖头。这种锥角提供纤维探头尖端更多的光，增加的光反过来大大增加纳米传感器的灵敏度。

特纳（Turner）方法可重复性受到环境参数强烈影响，如温度和振动，由于蚀刻工艺双化学性质。若要避免这样的问题，研究人员开发了包括管蚀刻在内的不同蚀刻法。在此过程中，硅芯光纤与有机涂层材料放入氟化氢溶液中。氟化氢慢慢溶解硅芯，产生具有锥角与纳米大小尖头的纤维。氟化氢开始先溶解硅纤芯，同时又不影响有机覆层材料。这种不影响氟化氢溶液中包层创建电流对流定位，形成探头尖头。经过一段时间后，越来越多的硅核心被溶解，最后溶解的硅出现在氟化氢溶液表面。在此关头，氟化氢通过毛细管作用制备了电镀墙，并沿着二氧化硅芯产生纳米级探头尖端。通过改变氟化氢在氟化氢溶液中暴露时间，以及纤维浸入氟化氢溶液中的深度，可以控制的光纤探头尖的大小和锥度的角度。探头尖端一旦形成，可以用合适的有机溶剂或通过简单地燃烧将突出电镀层去除。用蚀刻程序设计具有尖锐尖头制备的纳米探头，已用于近场光学显微镜的研究，以亚波长空间分辨率检测固体基底上 SERS 标记的 DNA 分子[12,13]。

17.3.2　纳米纤维探针上生物受体的固定化

纳米传感器探针的制备包括纳米纤维探针尖端受体的共价固定化。对于抗体结合，可以用若干种策略来保持传感探头的抗体。无论什么方法都有一个要求，就是抗体必须尽可能多地保留与抗原结合活性。也许最简单的方法包括适合在传感器端部的半透膜帽溶液中装入抗体[2]。然而，这样的设计更复杂，会增加纳米传感器尖头的尺寸。

抗体可以通过用化学固定方法固定在纳米纤维的探针上。该纤维在 H_2O 中 10%（*V*/*V*）3-甘油丙基三甲氧基硅烷（GOPS），90℃衍生 3h。用浓 HCl（1mol/L）将混合物的 pH 保持低于 3.0。衍生后，乙醇洗涤纤维，并在真空烘箱中 105℃干燥过夜。如前所述纤维再用银包被。衍生纤维在乙腈内 100mg/ml 的 1,1′-羰基二咪唑溶液中活化 20min，

接着用乙腈，然后用磷酸盐缓冲液（PBS）漂洗。光纤头在 1.2mg/ml 抗体液（PBS 溶剂）4℃保温 4 天，并在 PBS 中储存过夜以水解未反应的位点。该纤维与存储于 PBS 中抗体固定化探头在 4℃下储存。这一方法已证明可维持大于 95%的抗体活性[21]。

17.3.3　实验方案

本节介绍纳米传感器分析用细胞培养的方案。在水夹套细胞培养箱中 5% CO_2，37℃培养细胞。大鼠肝脏上皮细胞系克隆 9 细胞，在含 F-12 培养基（Gibco）中补充 10%胎牛血清和外加 1mmol/L 谷氨酰胺（Gibco）中培养。在准备实验中，将内含 1×10^5 个细胞的 5ml 培养基接种到标准培养皿中。通过显微镜观察每日监测细胞的生长。当细胞达到 50%～60%融合状态时，加入分析物溶液并与细胞接触 18h（即过夜）。这个程序的目的是培养具有分析物分子的细胞，用于纳米传感器进行后续监测。

选择生长条件，使得对数期生长细胞在化学处理中不会如此接近融合，由末端化学暴露形成融合单层。采用试剂级甲醇中 1mmol/L 的储备液，并加入细胞前用试剂级乙醇（95%）进一步稀释制备分析物溶液。接着进行化学处理，将含有分析物的培养基吸出，并在纳米探针加工前用标准生长培养基替换。

在单个细胞中监测靶分析物分子，抗体纳米探针按如下方法进行：将细胞培养皿放置于预热显微镜平台上，纳米探针安装到微量移液管支架上，移入位置（即在细胞同一平面上），使用明视野显微镜照明，从而使探头尖头探测细胞外面。总放大倍数通常×400。在没有任何室内光线和无显微照明的情况下，打开激光快门，照亮光导纤维激发分析物分子与光纤尖端的抗体结合。通常情况下，如果纳米探针的银包被层是合适的，那么锥形光纤的侧壁就没有光泄漏。用纳米探针可观察到尖端激光激发只有淡淡的光晕。首先是细胞外与激光快门关闭条件下，纳米探针发生的读数。然后纳米探针插入细胞内，细胞膜内并扩展到感兴趣的细胞器。再次打开激光，并且读取产生的读数并记录纳米探针在细胞内的工作时间。

17.3.4　光学检测仪器

用纳米传感器监测单个细胞的光学检测系统如图 17.6 所示 [18~21]。激光的激发光（一种 HeCd 激光器 325nm 线（Omnichrome；8mW 激光功率）的任一或氩离子激光器 488nm 的线（连续 10mW）聚焦到 600μm 递送纤维，这是通过一个 SMA 连接器连接到纳米纤维。纳米纤维被固定到显微镜显微操纵器上。用于探测单个细胞的实验装置是从标准显微到显微注射装置适于此目的。尼康 Diaphot 300 倒置显微镜具有 Diaphot 300/Diaphot200 孵化器，在用于这些实验显微镜平台上 37℃培养细胞。使用的显微设备包括 MN-2 Narishige 3D 粗调操控器和 Narishige MMW-23 3D 液压显微精细运动操作器。光纤纳米探针安装在一个微量移液管支架上（世界精密仪器）。细胞发出的荧光通过显微镜物镜收集，并穿过适当的长通分色镜消除激光散射光。然后荧光光束聚焦到光电倍增管（PMT）检测。光电倍增管的输出信号，通过皮安计并在带状图形记录器记录或用个人计算机对数据进一步处理。为了记录光纤尖头分析物分子与抗体结合的荧光，Hamamatsu PMT 检

测器组件（HC125-2）安装在 Diaphot 300 显微镜的前端口，经该光通路收集（可以通过前端口收集 80%在聚焦平面可用光线）荧光。安装在显微镜的另一个端口的电耦合元件可用来记录纳米传感器监测单细胞的图像。

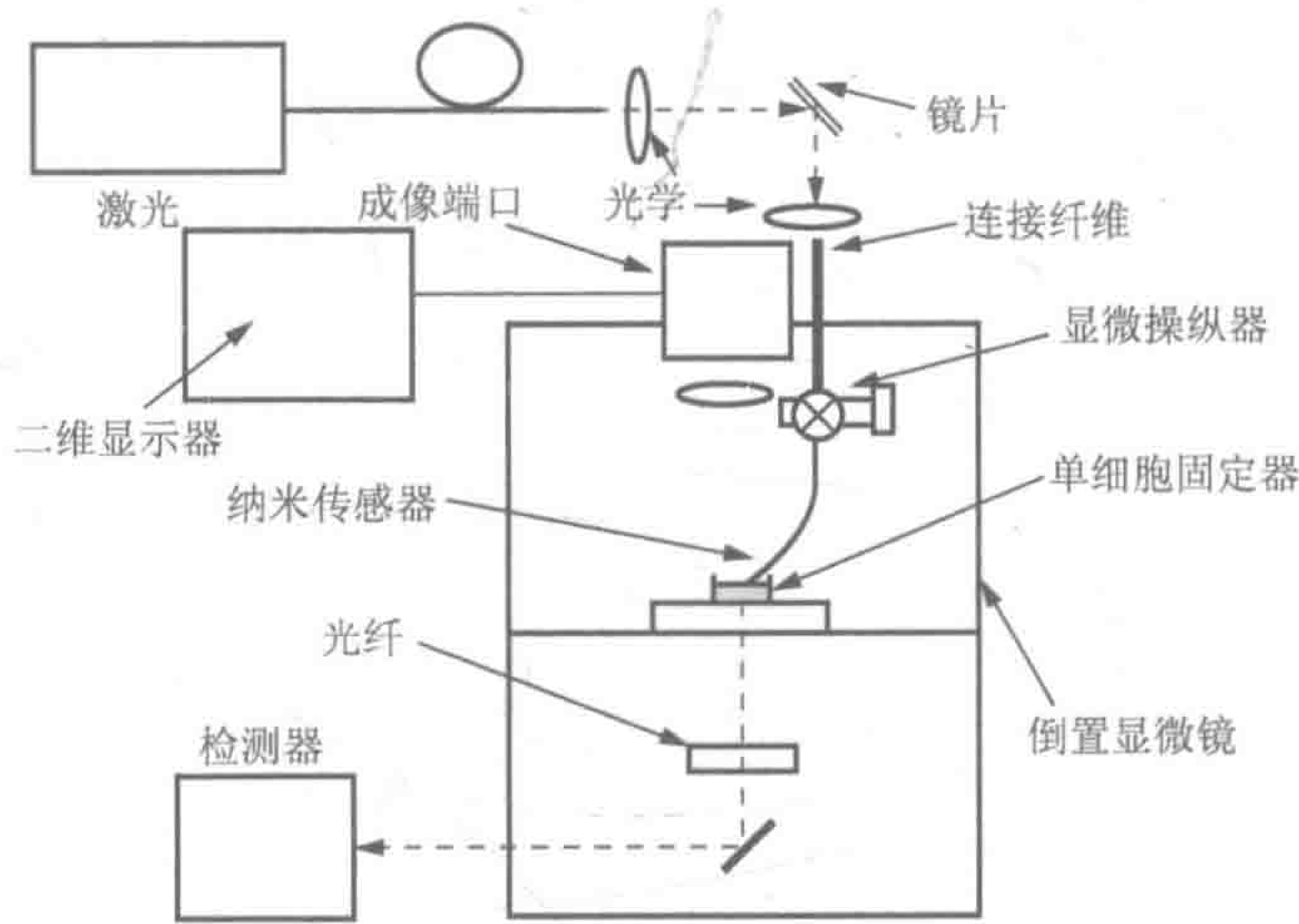


图 17.6　用纳米传感器检测单细胞荧光的仪器

17.4　应　　用

17.4.1　单个活细胞生物标记物的监测

这种新型传感器的纳米级尺度允许其在最小的环境中进行测量。这样一种环境引起人们极大兴趣的是单细胞的测定。使用这些纳米传感器，它使探测细胞内个别化学物质的特异性定位成为可能。以前，完成这样的测量只有通过荧光显微镜来完成，其中荧光染料是插入到细胞，并扩散到整个细胞。这取决于选择的荧光染料，改变染料的荧光特性，随后以成像形式进行监测，因为进来的染料与目的的分析物接触。由于该技术依赖于成像的荧光染料，它要求该染料在细胞中不同位置均质分布，这就受到细胞内条件（如 pH）的限制，或甚至常常不会出现细胞的区分。因此，制备的光纤纳米传感器，可以提供对这类方法的显著改进和消除与细胞扩散有关的问题。

已经证明有抗体探针纳米传感器，可以测量单细胞内特异性荧光靶[18~23]。因为细胞是非常小的（1～10μm），细胞内的成功研究取决于几个因素，其中包括测量系统的灵敏度、探针的选择性和纳米纤维探针的小尺度。Vo-Dinh 等[21]报道了在最小细胞内用光纤纳米生物传感器进行无损探测。在他们的工作中，抗体探针靶向苯并[a]芘四醇（BPT），即一种重要的生物化合物，它作为人暴露于致癌物 BaP 中的生物标记物，大环境的多环芳烃和毒理学引起人们极大的兴趣，是由于其致突变性/致癌性和环境中无处不在。实验动物研究已确认 BaP 为化学致癌物。小体积探针允许纳米传感器在细胞内的特定位置进行操作。测量前，按以前介绍的实验步骤，将细胞与 BPT 一起温育。单细胞存在 BPT

的探索是用抗体纳米探针激发并用光度计系统检测荧光信号来实现。

采用纳米传感器测量了两种不同细胞系：人乳腺癌细胞和大鼠肝脏上皮细胞（克隆9）细胞质中的 BPT 的浓度。用过量 BPT 培养介质处理后，大鼠肝脏上皮细胞作为模型细胞系统。图 17.7 显示实际插入到一个人乳腺癌单细胞的纳米传感器的数字图像。结果证实了单个细胞内 BPT 原位测定的可能性。

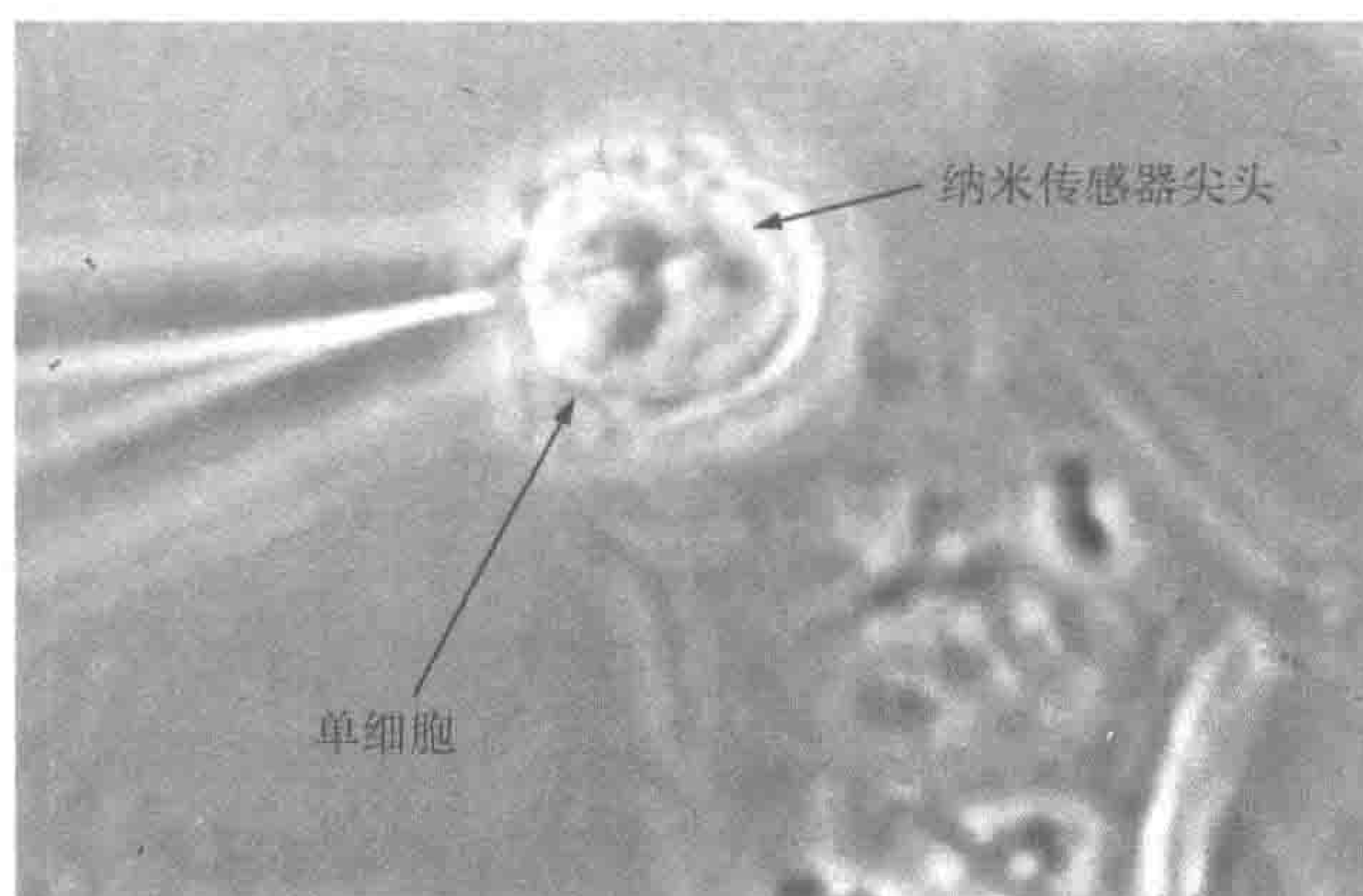


图 17.7　光纤纳米传感器监测人乳腺癌单细胞（彩图请扫封底二维码）

需要注意的是，由于在特定时间内，探头只进行一次测定和由于抗体-抗原结合过程中的强缔合常数不能重复使用，这些纳米传感器都装备了单次使用的生物探针。然而，使用超声波可使抗体探针再生。我们的实验室已成功研制出利用超声波的方法（美国），从抗体中以非侵袭性释放抗原分子，从而再生抗体生物传感器[30]。对乳腺癌抗原的抗体探针监测的结果说明，其有效性和可再生的免疫传感器的潜力。在这种情形下，美国实验室除去固定在纤维表面上与单克隆抗体结合的抗原，抗体探针再生已达到 65%。美国再生方案是对纳米传感器有巨大潜力的无损方法。结果证明美国从抗体探针中释放抗原的这种方法非常有效。

我们完成了含有不同浓度 BPT 溶液的多次校准测量，获得了 BPT 分子数量检测的定量评估方法。使用特异性纳米探针可获得多达 5 个荧光信号量记录。为了校准测量，将纤维置于含有 BPT 溶液，从 1.56×10^{-10}～1.56×10^{-8}mol/L 浓度的培养皿中。通过从一个浓度至下一个对应 BPT 的浓度荧光绘制增加图，将这些数据与指数函数拟合，以便模拟饱和条件，我们确定了 BPT 在单个细胞研究中的浓度为$(9.6\pm0.2)\times10^{-11}$mol/L [17~21]。

还开发了致癌 BaP 的原位监测的纳米传感器[30]。单细胞内 BaP 运输的检测具有重大的生物医学意义，因为它可以作为导致 DNA 破坏的 BaP 监测手段[28]。为了完成这些监测，有必要使用靶向 BaP 抗体。荧光 BaP 分子通过与固定化抗体的受体相互作用而结合，形成受体-配体复合物。随着这个复合物的激光激发，BaP 响应的荧光提供了被监视细胞中 BaP 浓度量化的基础。所产生的荧光信号可以得到高灵敏度检测。细胞内 BaP 测定与反应时间有关。本研究建立的用于抗体的 BaP 络合反应时间为 5min。这可作为从光纤到光纤校准的标准时间。此外，纳米传感器通过使用参比溶液已知浓度的测量值，进行标准分析程序校准。

17.4.2　单个活细胞中细胞凋亡蛋白酶蛋白信号对细胞凋亡的检测

在过去的几年中，人们越来越多的兴趣集中于监测活细胞凋亡工具和技术的开发。已越来越明确，线粒体对细胞凋亡过程起主要作用。线粒体关键组分调节凋亡作用有两个控制点，即位于紧密靠近线粒体内外膜位点的通透性转换孔复合物（PTPC）和刚好位于线粒体外面的凋亡复合体。如图 17.8 所示，抗癌药常常诱导细胞凋亡，对通透性转换孔复合物的作用是诱导线粒体促凋亡因子的释放。这些因子刺激凋亡复合体的组装，随后激活细胞凋亡蛋白酶-9（胱天蛋白酶-9）启动子和细胞凋亡蛋白酶-3（胱天蛋白酶-3）效应器，从而导致细胞凋亡。该凋亡主要控制点是细胞凋亡蛋白酶-9 和细胞凋亡蛋白酶-3 相互作用并相互激活。在凋亡复合体中细胞凋亡蛋白酶-9 加工细胞凋亡蛋白酶-3，从而激活它。在反馈回路中，加工的细胞凋亡蛋白酶-3 剪切和激活细胞凋亡蛋白酶-9，扩大激活的胱天蛋白酶（即细胞凋亡蛋白酶）的产生。第二个正反馈回路连接着凋亡复合体和通透性转换孔复合物。细胞凋亡蛋白酶-3 剪切线粒体电子转移链中的许多组分。这些操作触发提高活性氧物质（ROS）的产生和细胞色素 c 的流出，然后以凋亡复合体作用使活化细胞凋亡蛋白酶-9 和细胞凋亡蛋白酶-3 的活化量增加。

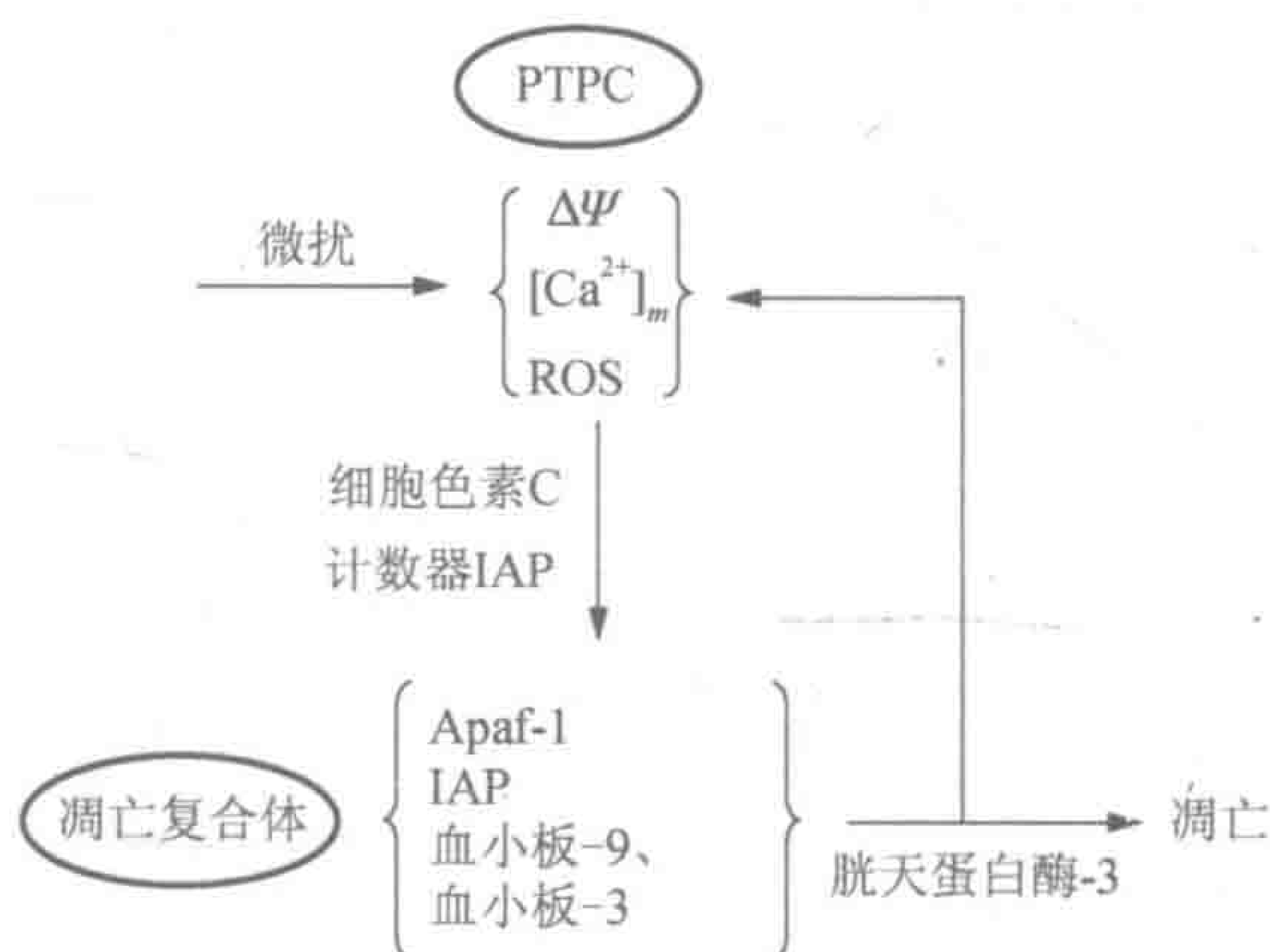


图 17.8　线粒体凋亡控制单位示意图

通过检测细胞凋亡蛋白酶-9[24]的酶活性，监测活的单细胞中的线粒体凋亡途径，我们完成了纳米传感器的应用和监测功效研究。采用免疫化学测定模式，对非荧光酶底物亮氨酸-谷氨酸-组氨酸-天冬氨酸-7-氨基-4-甲基香豆素（LEHD-AMC）固定化进行修饰的光学纳米传感器，证明了对 MCF-7（乳腺癌细胞，译者注）单个活细胞的细胞凋亡蛋白酶-9 微创分析。 LEHD-AMC 共价连接到光学纳米传感器探头上，由细胞凋亡蛋白酶-9 凋亡过程中切割产生游离的 AMC。用渐逝场激发裂解 AMC 和检测所得的荧光信号。通过定量监测荧光信号的变化，我们检测到 MCF-7 单个活细胞内的细胞凋亡蛋白酶-9 的活性。人 δ-氨基乙酰丙酸（ALA）光子动力学疗法方案用于诱导 MCF-7 细胞凋亡[32]。用细胞凋亡蛋白酶-9 裂解底物 LEHD-AMC，并且激发释放 AMC 分子发射荧光信号。通过比较凋亡细胞和未诱导的对照荧光，我们检测和鉴定了细胞凋亡蛋白酶-9 的活性。

研究结果表明，在细胞治疗的对照组中，相对于实验组的荧光信号是微不足道的。细胞与人 δ-氨基乙酰丙酸同时保温，从细胞中所获得的荧光信号和光活化，比从两个对照组所获得的信号要高得多。存在 MCF-7 活的单细胞中分解的 AMC 和检测实验结果，代表细胞凋亡蛋白酶-9 的活性和细胞凋亡的标志。这些结果表明，用光学纳米传感器可以监测和测量单个活细胞中的 AMC 和后期的细胞凋亡。这些研究显示，无需干扰生理结构而研究细胞的可能性，并在这个过程中，干预细胞的生物化学。

17.5 结　论

本章中介绍的纳米传感器技术，属于能够极大地改变我们基本了解生命过程自身地位的新时代纳米工具。活细胞内信号转导过程的动态信息，对于了解细胞本质非常重要。许多传统的显微镜技术，包括用荧光染料或纳米颗粒培养细胞，并检查这些染料与目的化合物的相互作用。然而，当染料或纳米颗粒孵育导入细胞时，它可能被运送到细胞内的位点，研究者希望对最有可能逗留或不逗留的区域进行监测。假如荧光信号反映染料与所关注的化学药品相互作用，一般都直接与染料浓度相关而与分析物浓度相反。只有用光学纳米传感器才能将激发光传递到细胞内特定位置。到今天为止，纳米传感器是用于测量活细胞生物靶分子而不影响细胞生存能力的唯一技术。结合抗体探针精密的分子识别，纳米传感器有很大的潜力，成为探索活细胞亚细胞器分子生物学过程的强有力的工具。

纳米传感器最终可能导致为早期诊断、医疗救治和对个别细器官甚至 DNA 等生命元件，超越细胞水平的预防新模式的发展。如今，这些新的高效的纳米研究工具，在分子水平上研究生物医学科学和工程正在呈指数增长。这些新的分析工具能够探测纳米世界，并将使表征细胞化学和力学性能，探索制造分子蛋白质机器，发现新现象和新途径成为可能，也将为科学研究提供更广范围的工具、材料、设备和独特能力的系统。基因组学、电子学、生物材料和光电子的联姻，21 世纪有望彻底改变医学的许多领域。这些技术的最终融合将为检测、诊断和防治研究的新工具发现和生物标志物的发现，以及为治疗发展找到新的靶分子开拓新的视野。

致谢

我要感谢 J. D. Griffin、J. P. Alarie、B. M. Cullum 和 P. Kasili 对本书所做出的贡献。本项研究得到了美国能源部劳伦斯利弗莫尔国家实验室定向研究和发展项目（先进的纳米传感器）、橡树岭国家实验室管理的能源部 UT-Battelle 责任有限公司合同 DE-AC05-00OR22725 的赞助。

参 考 文 献

[1] Zandonella, C. (2003) The tiny tool kit. *Nature* 423, 10–12.

[2] Vo-Dinh, T., Tromberg, B. J., Griffin, G. D., Ambrose, K. R., Sepaniak, M. J., and Gardenhire, E. M. (1987) Antibody-based fiberoptics biosensor for the carcinogen benzo(a)pyrene. *Appl. Spectrosc.* 41(5), 735–738.

[3] Vo-Dinh, T. G. G. D. and Sepaniak, M. J. (1991) Optical antibody biosensor, in *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors* (Wolfbeis, O. S., eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 217–257.

[4] Vo-Dinh, T., Sepaniak, M. J., Griffin, G. D., and Alarie, J. P. (1993) Immuno-sensors: principles and applications. *Immunomethods* 3, 85–90.

[5] Alarie, J. P. and Vo-Dinh, T. (1996) Antibody-based submicron biosensor for benzo a pyrene DNA adduct. *Polycyclic Aromatic Compounds* 8(1), 45–52.

[6] Alarie J. P. and Vo-Dinh, T. (1991) A fiberoptic cyclodextrin-based sensor. *Talanta* 38, 529–534.

[7] Tromberg, B. J., Sepaniak, M. J., Alarie, J. P., Vo-Dinh, T., and Santella, S. M. (1998) Development of antibody-based fiberoptics sensor for the detection of benzo(a)pyrene metabolite. *Anal. Chem.* 60, 1901–1905.

[8] Alarie, J.P., Bowyer, J.R., Sepaniak, M.J., Hoyt, A.M., and Vo-Dinh, T. (1990) Fluorescence monitoring of benzo(a)pyrene metabolite using a regenerable immunochemical-based fiberoptic sensor. *Anal. Chim. Acta* 236, 237–243.

[9] Bowyer, J. R. Alarie, J. P., Sepaniak, M. J., Vo-Dinh, T., and Thompson, R. Q. (1991) Construction and evaluation of regenerable, fluoroimmunochemical-based fiber optic biosensor. *Analyst* 116, 117.

[10] Pohl, D. W. (1984) Scanning near-field optical microscopy, in *Advances in Optical and Electron Microscopy* (Sheppard, C. J. R. a. M., T., ed.), Academic, London.

[11] Betzig, E. and Chichester, R. J. (1993) Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. *Science* 262(5138), 1422–1425.

[12] Zeisel, D., Deckert, V., Zenobi, R., and Vo-Dinh, T. (1998) Near-field surface-enhanced Raman spectroscopy of dye molecules adsorbed on silver island films. *Chem. Phys. Lett.* 283(5–6), 381–385.

[13] Deckert, V., Zeisel, D., Zenobi, R., and Vo-Dinh, T. (1998) Near-field surface enhanced Raman imaging of dye-labeled DNA with 100-nm resolution. *Anal. Chem.* 70(13), 2646–2650.

[14] Tan, W. H., Shi, Z. Y., and Kopelman, R. (1992) Development of submicron chemical fiber optic sensors. *Anal. Chem.* 64(23), 2985–2990.

[15] Tan, W. H., Shi, Z. Y., Smith, S., Birnbaum, D., and Kopelman, R. (1992) Submicrometer intracellular chemical optical fiber sensors. *Science* 258(5083), 778–781.

[16] Cullum, B. M., Griffin, G. D., Miller, G. H., and Vo-Dinh, T. (2000) Intracellular measurements in mammary carcinoma cells using fiber-optic nanosensors. *Anal. Biochem.* 277(1), 25–32.

[17] Vo-Dinh, T. G. G. D., Alarie, J. P., Cullum, B. M., Sumpter, B., and Noid, D. (2000) Development of nanosensors and bioprobes. *J. Nanoparticle Res.* 2, 17.

[18] Vo-Dinh, T. and Cullum, B. (2000) Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366(6–7), 540–551.

[19] Cullum, B. M. and Vo-Dinh, T. (2000) The development of optical nanosensors for biological measurements. *Trends Biotechnol.* 18(9), 388–393.

[20] Vo-Dinh, T., Cullum, B. M., and Stokes, D. L. (2001) Nanosensors and biochips: frontiers in biomolecular diagnostics. *Sens. Actuators B* 74, 2.

[21] Vo-Dinh, T., Alarie, J. P., Cullum, B. M., and Griffin, G. D. (2000) Antibody-based nanoprobe for measurement of a fluorescent analyte in a single cell. *Nat. Biotechnol.* 18(7), 764–767.

[22] Vo-Dinh, T. (2003) Nanobiosensors: probing the sanctuary of individual cells. *J. Cell. Biochem.* Suppl. 39, 154–161.

[23] Kasili, P. M., Cullum, B. M., Griffin, G. D., and Vo-Dinh, T. (2002) Nanosensor for in-vivo measurement of the carcinogen benzo [a] pyrene in a single cell. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6, 653.

[24] Kasili, P . M., Song, J. M., and Vo-Dinh, T . (2004) Optical sensor for the detection activity of caspace 9 in a single cell. *J. Am. Chem. Soc.*, in press.

[25] Vo-Dinh, T. (1998) Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanostructures. *Trends Anal. Chem.* 17, 557.

[26] Turner, D. R. (1984) US patent no. 4,469,554.

[27] Hoffmann, P., Dutoit, B., and Salathe, R. P. (1995) Comparison of mechanically drawn and protection layer chemically etched optical fiber tips. *Ultramicroscopy* 61(1–4), 165–170.

[28] Lambelet, P., Sayah, A., Pfeffer, M., Philipona, C., and Marquis-Weible F. (1998) Chemically etched fiber tips for near-field optical microscopy: a process for smoother tips. *Appl. Opt.* 37, 7289–7292

[29] Stockle, R., Fokas, C., Deckert, V., Zenobi, R., Sick, B., Hecht, B., and Wild, U. P. (1999) High-quality near-field optical probes by tube etching. *Appl. Phys. Lett.* 75(2), 160–162.

[30] Morena-Bondi, M., Mobley, J., Alarie, J. P., and Vo-Dinh, T. (2000) Antibody-based biosensor for breast cancer with ultrasonic regeneration. *J. Biomed. Opt.* 5(3), 350.

[31] Ricci, J. E., Gottlieb, R. A., and Green, D. R. (2003) Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J. Cell Biol.* 160, 65–75.

[32] Hengartner, M. O. (2002) Apoptosis—DNA destroyers. *Nature* 412, 27–29.

第 18 章　原子力显微镜微悬臂纳米电极集成的原位酶活性成像

Angelika Kueng, Christine Kranz, Alois Lugstein,
Emmerich Bertagnolli, Boris Mizaikoff

概　述

为了研究生物活性信息横向分辨率，同时获得与时间和空间相关互补信息的技术。针对这种情况，最近扫描探针显微镜的发展瞄准了样品形貌图像信息，并同时获得纳米量级物理和化学性质的信息。随着微细加工技术将亚微米和纳米电极集成原子力显微镜（AFM）探针，扫描电化学显微镜与原子力显微镜合并的优秀方案已获得肯定。该仪器能够对形貌图和在 AFM 轻敲模式获得的横向分辨率电化学信息同时成像。因此，可以在软表面（如生物物质）和聚合物上获得形貌图像信息和电化学信息。通过同时存在的电化学和酶修饰微型模式剖析研究证明了集成探头电极的功能。

关键词：扫描电化学显微镜；原子力显微镜；酶活性；轻敲模式；双功能的扫描探针尖头

18.1　导　论

扫描探针技术组合的最新发展是针对互补，以空间高分辨率同时获得有关物理、化学表面性质的信息。由于许多生化相关进程均基于氧化还原的化学和电化学分子转化，采集氧化还原耦合过程横向分辨率信息技术特别有意义。原子力显微镜（AFM）[1]与扫描电化学显微镜（SECM）相结合[2~4]对于横向高分辨率的单程时间和空间相关性测量，获得互补电化学和形貌信息是特别有吸引力的策略[5]。微细加工包括亚显微聚焦离子束（FIB）技术和纳米电极集成常规 AFM 探头，是一种优秀的多功能与 SECM 和 AFM 相结合的方法[6,7]。AFM 和 SECM 是用于表述仪器及技术的术语。电活性区域是整合在原子力显微镜探针尖头精确限定距离内[8]，使得能够按接触模式和轻敲模式操作[9]。原子力显微镜轻敲模式[10]的应用是柔性生物样品或聚合物成功成像的先决条件[11~13]。

为了说明该方法的功能和能力，应用双功能探针与集成电极，对在 AFM 轻敲模式中的生物活性样品的形貌和电化学性能同时作图。固定在软聚合物基质周期性微模型的葡萄糖氧化酶、氧化还原酶活性是形态作图过程中电化学成像的一个实例[14]。当前这一概念正在延伸到生物医学的原子力显微镜探头集成的电化学生物传感器[15~17]。

18.2 材　　料

1）原子力显微镜配备轻敲模式液态池（如 Nanoscope III；Digital Instruments 公司，圣巴巴拉，加利福尼亚州，美国）。

2）双恒电位仪（型号：832A；CH-Instrument 公司，奥斯汀，得克萨斯州，美国）。

3）FIB 系统。

4）拥有 Ti 靶直流溅镀仪。

5）配备有 Au 或 Pt 靶的射频溅镀仪。

6）气相沉积聚合（VDP）系统或等离子增强化学气相沉积（PECVD）。

7）氮化硅 AFM 长度为 200μm 悬臂、集成锥体探头（底部为 4μm×4μm；高度为 2.86μm）和大约 0.06Nm 的弹簧常数。

8）微模式金/氮化硅样品（Quantifoil 公司，耶拿，德国）。

9）氯对二甲苯（聚对二甲苯 C）。

10）铂丝（直径：1mm）作为反电极。

11）Ag/AgCl 参考电极或氧化银线（直径：1mm），其作为一准参比电极（AgQRef）。

12）绝缘清漆（RS Components 公司，北安普敦郡，英国）。

13）葡萄糖氧化酶（150 000U/g，固体，来自黑曲霉 *Aspergillus niger*）；储存在−20℃。

14）亚铁氰化钾。

15）氯化钾。

16）存放于 4℃的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液（pH 7.0）。

17）葡萄糖。

18）EDP、Elektrodepositionslack Glassophor ZQ 8-43225、Canguard（BASF Farben und Lacke 公司，明斯特，德国）。

18.3 方　　法

18.3.1 AFM-SECM 探头的制备

18.3.1.1～18.3.1.3 节操作步骤，概述了 AFM-SECM 探头，包括金属化和悬臂绝缘制备方法，FIB 切割加工是为了电活性区域和探头-集成电极特征的显露。

18.3.1.1 AFM 悬臂金属化和绝缘

AFM 氮化硅悬臂是直流溅射（CVC 产品）拥有 3nm 钛黏附层（工作压力为 6mtorr[①]；

---

① 1mtorr≈0.133Pa

功率为350W；在氩气存在下）。随后，采用RF-溅镀（工作压力为6mtorr；功率为150W；氩气存在下）沉积100nm均匀金层，以最大限度地减少悬臂上机械压力（见18.4节注意事项1）。为了镀金涂层悬臂的绝缘，用VDP沉积700nm聚对二甲苯C（见18.4节注意事项2）[18]。聚合过程包括下列步骤。

1）在150℃，1.0torr初始汽化。

2）在680℃，0.5torr高温分解剪切成单体自由基。

3）单体自由基吸附到样品（悬臂）表面并同时聚合。

18.3.1.2 AFM-SECM悬臂的聚焦离子束光刻技术铣削

如图18.1所示，沿着铣削工序的聚焦离子束光刻技术（FIB）图，集成框架微电极的制作步骤。所有修饰，均在50keV镓离子束于FIB（Micrion 2500）双透镜系统中进行。

图18.1A显示金属层和绝缘层包被后的悬臂。FIB铣削第一工序中，直接相对切割，如图18.1B所示，测定集成微电极的大小。第二步，悬臂转90°后锥体探头尖正面区域重复相同的切削过程（图18.1C）。接着铣削步骤（图18.1D）包括AFM尖头的整形，并调整与集成电极面积相关的长度。根据扫描电化学显微镜理论[19]优化电流响应，该改造的尖头（尖基底分离）应为小于0.7×电极边缘的长度（图18.1F）。在柱子侧面与正面区域必须再次重复这样的铣削步骤，整形非导电原始AFM探头。图18.1E显示最终的单程铣削步骤后，除去先前切割电活性表面积累材料的集成微电极。改造AFM探头的原因是确保集成电极与表面性质电化学工作距离内样品表面之间的形态高分辨率和精确定义及恒定的距离。

18.3.1.3 集成探头框架微电极的电化学表征

集成微电极的电化学表征是通过循环伏安法，用0.5mol/L KCl中0.01mol/L $K_4[Fe(CN)_6]$作为支持电解质（图18.2B）。目前，文献中还没有理论介绍，可用的方形框电极的几何形状。正在进行开发合适的理论。因此，将电化学行为表征用于环微电极的理论描述。环形微电极的稳态电流响应可以使用式（18.1）～（18.3）进行说明[20,21]：

$$I_d = nFDc^*l_0 \tag{18.1}$$

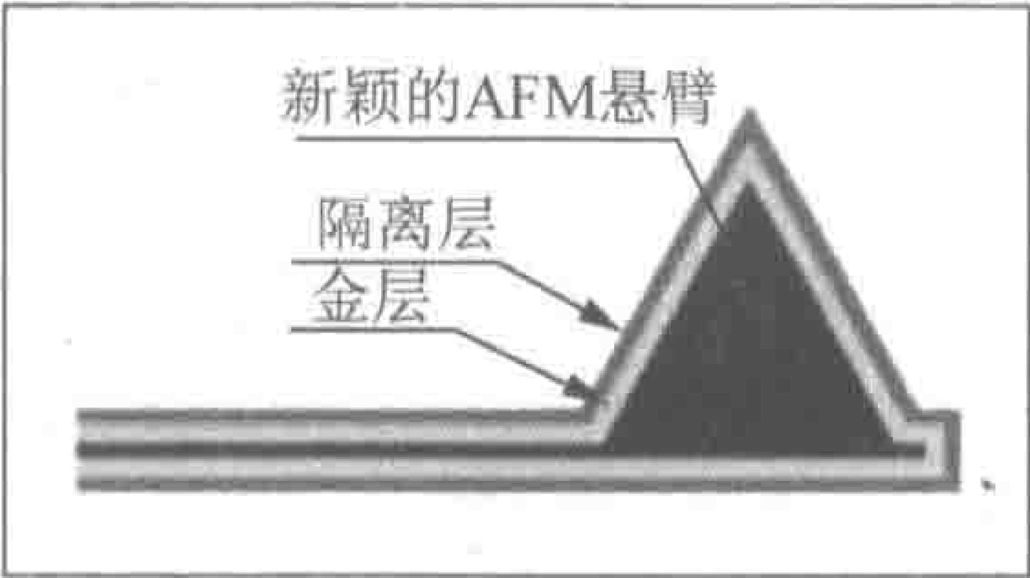
其中

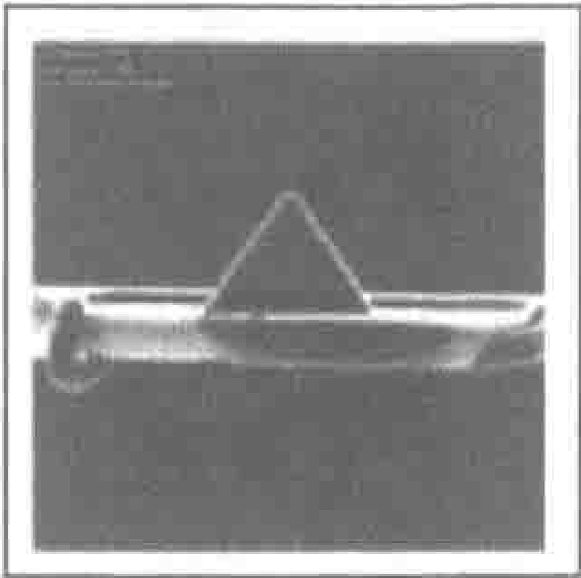
$$l_0 = \frac{\pi^2(a+b)}{\ln\left[16(a+b)/(b-a)\right]} \tag{18.2}$$

因为a/b＞0.91，和

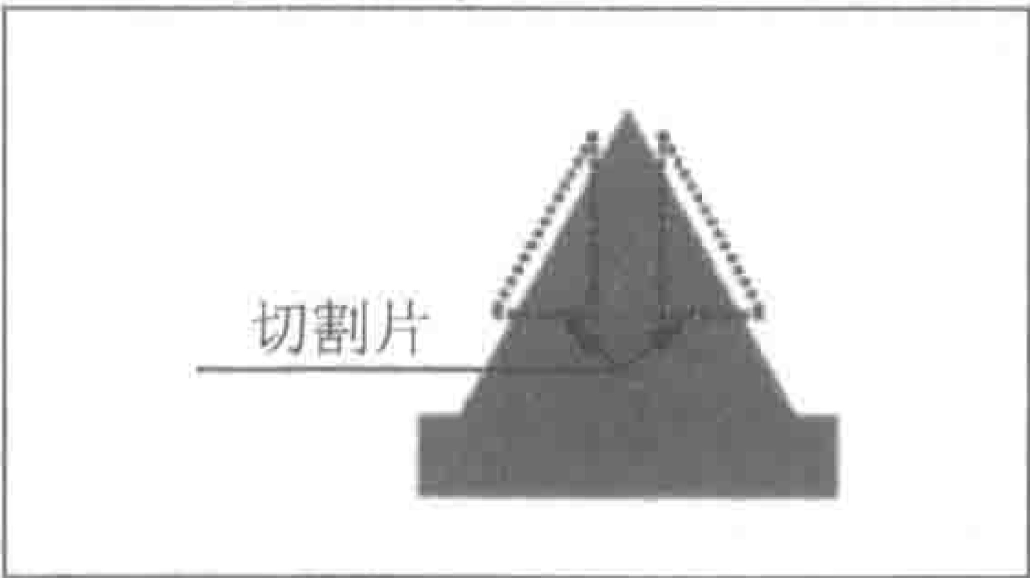
$$l_0 = \frac{\pi^2(a+b)}{\ln\left[32a/(b-a)+\exp(\pi^2/4)\right]} \tag{18.3}$$

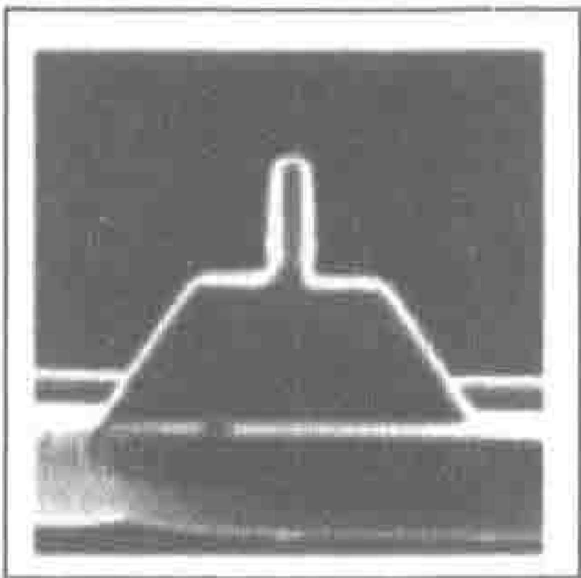
为全部其他的比率a/b。在式（18.1）～（18.3）中，D和c^*分别是扩散系数和氧化还原介质堆积浓度；F是法拉第常数；n是转移电子的数；a是内电极半径；b是外电极半径（图18.1F）。基于式（18.1）和式（18.2），理论稳态电流为0.01mol/L $[Fe(CN)_6]^{4-}$的氧化，其中n=1，图18.2A显示框架微电极的循环伏安图（内半径a=650nm；外半径b=750nm；比率a/b=0.867）经计算为1.65nA（扩散系数为$6.7\times10^{-6}cm^2/s$ [4]）。实验观察到的稳态电流为1.4nA。但是，必须认识到由于框架几何结构边缘发生的附加影响，对框架电极的扩散行为不同于环形几何形状。





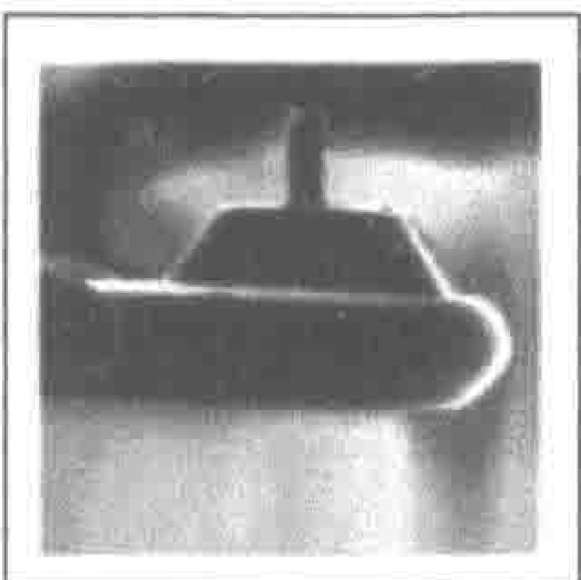
（A）用银层和隔离层修饰的Si_3N_4-悬臂



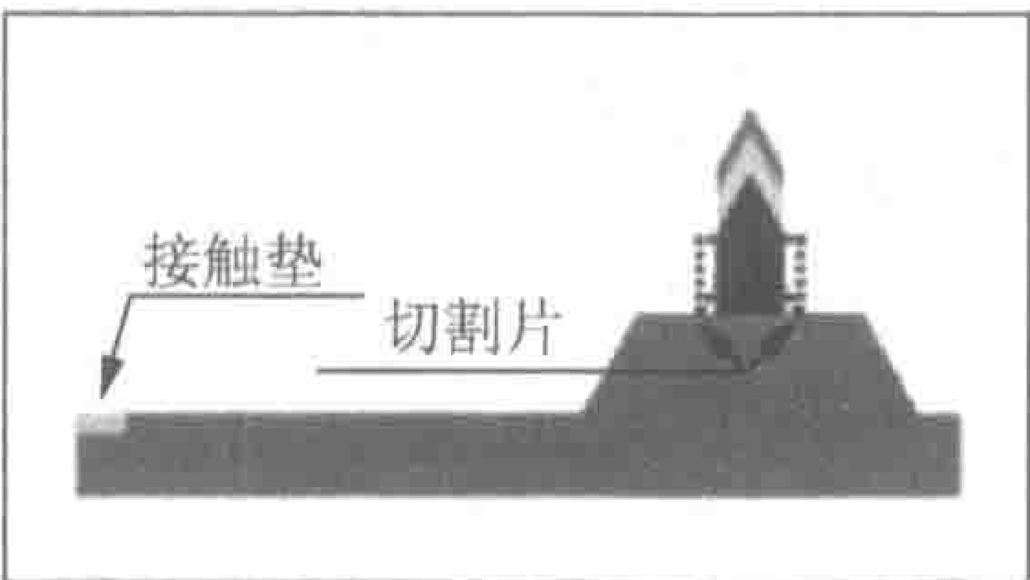


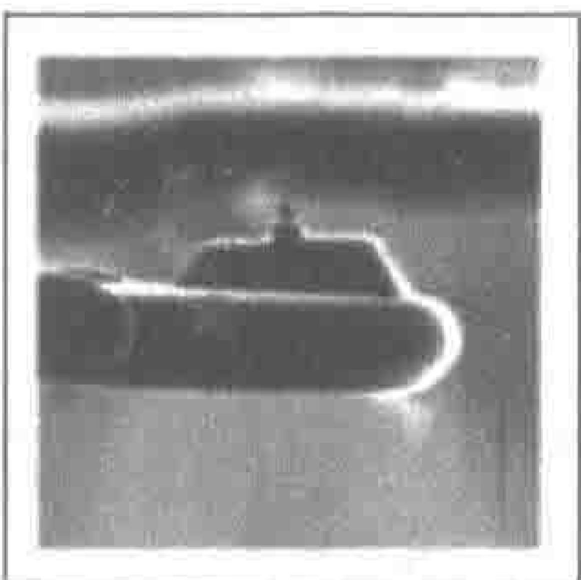
（B）直接通过反向切除，除去金属部分和原始氮化硅尖头部分



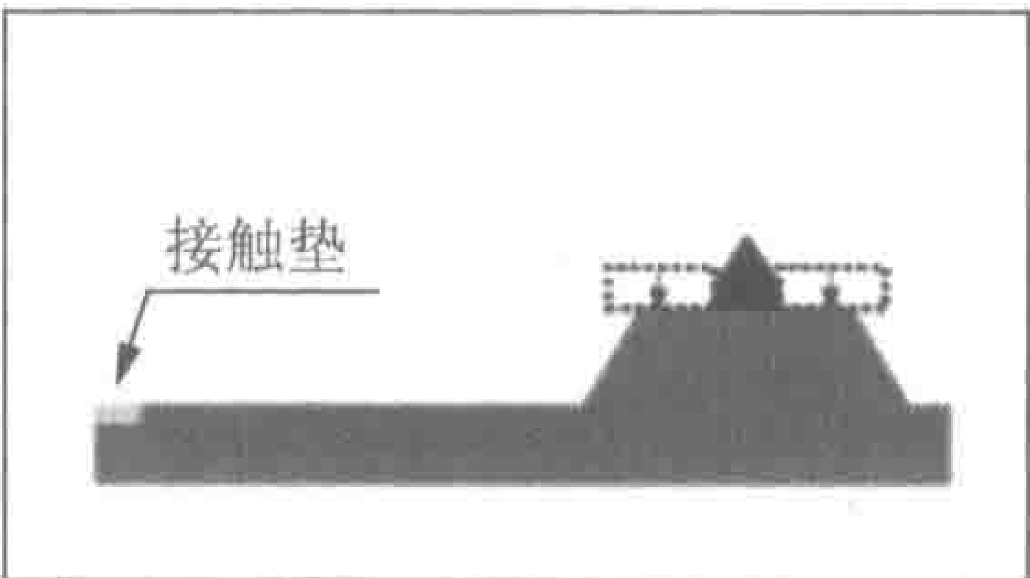


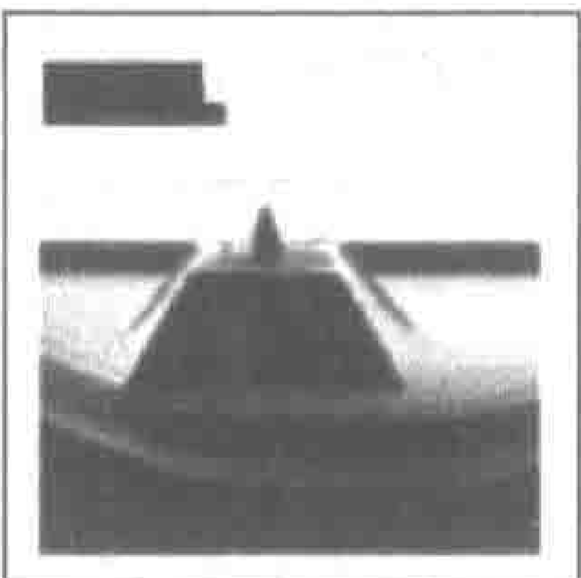
（C）悬臂转90°后，在锥形尖头的前区重复直接反向切除



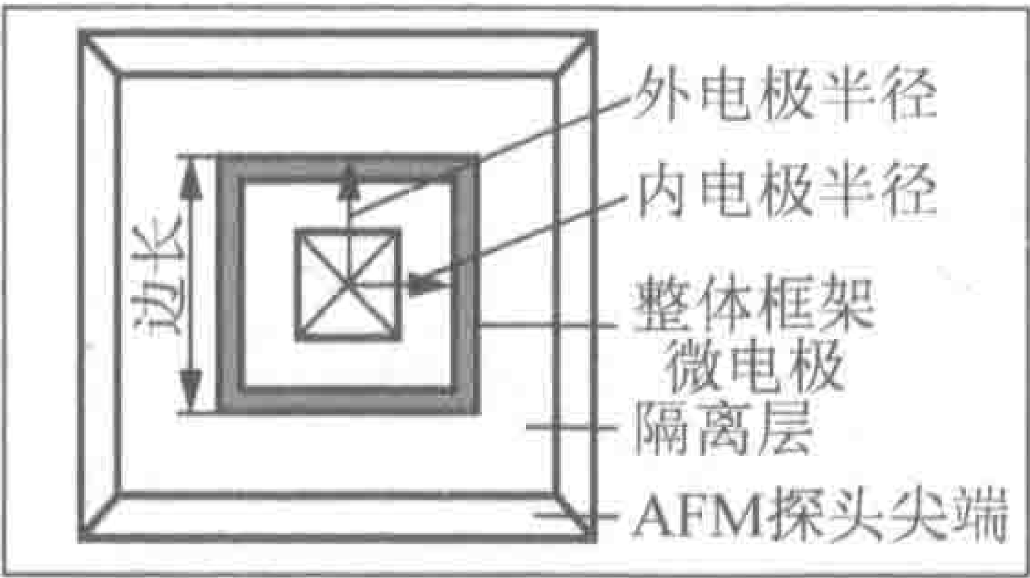


（D）重新成形柱子并根据电子活性区的大小调节柱子的长度





（E）最后通过铣削步骤以便去除沉淀材料



（F）边长1.5μm的整合框架电极示意图

图 18.1　（A～F）使用的 FIB 技术修饰涂覆 AFM 探头步骤，显示（左）处理步骤示意图和（右）相应的 FIB 图像（转载自参考文献[6]并征得许可）

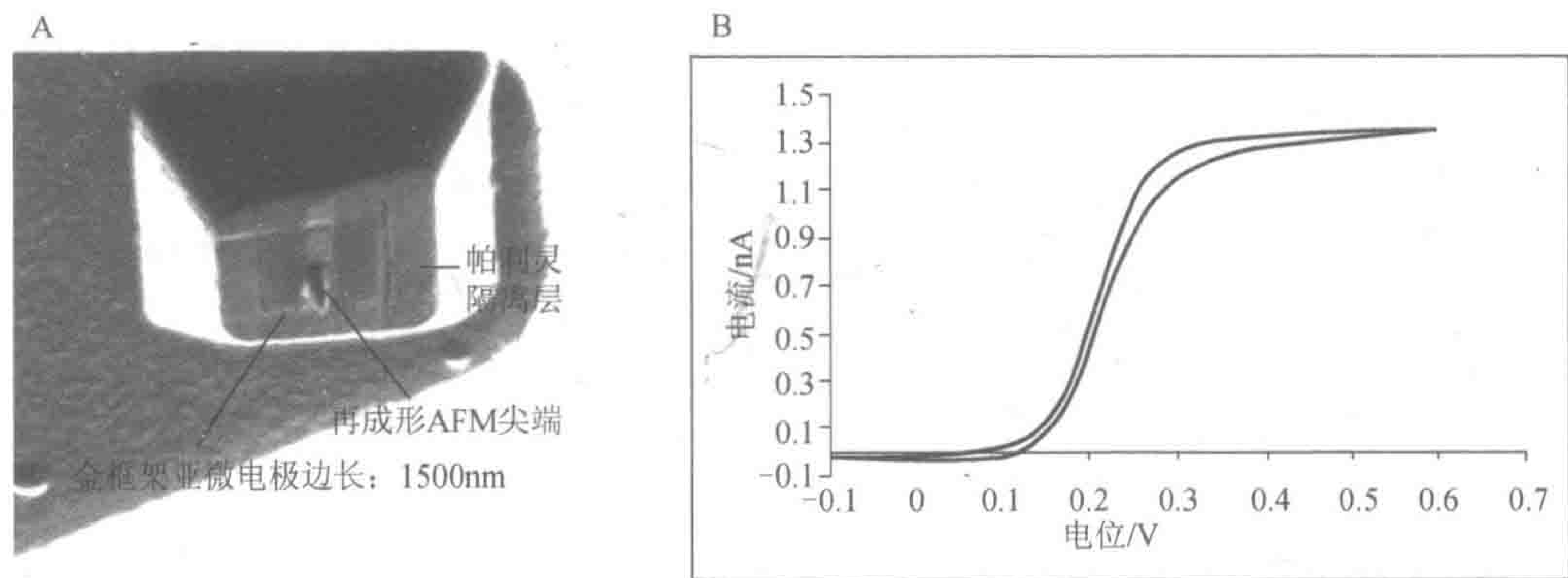


图 18.2　（A）有 1500nm 边长和 800nm 探头尖高的集成框架亚微米电极 FIB 图像；（B）用这个框架微电极在 0.5mol/L 的 KCl 中 0.01mol/L $K_4[Fe(CN)_6]$的氧化记录的循环伏安图（扫描速率为 100mV/s）

18.3.2　样品的制备

用双官能 AFM-SECM 探针，说明柔性生物样品的形貌和电化学性能的同时成像。作为测试样品，用包埋了葡萄糖氧化酶的柔软聚合物衬底填充周期性微结构的孔[14]（见 18.4 节注意事项 3）。

如图 18.3 所示，沿着 AFM 图样品表面的制造步骤。将周期性微模式氮化硅层（450nm 层厚度）沉积到包被金的硅晶片上（见 18.4 节注意事项 4）。导电金层作为工作电极，

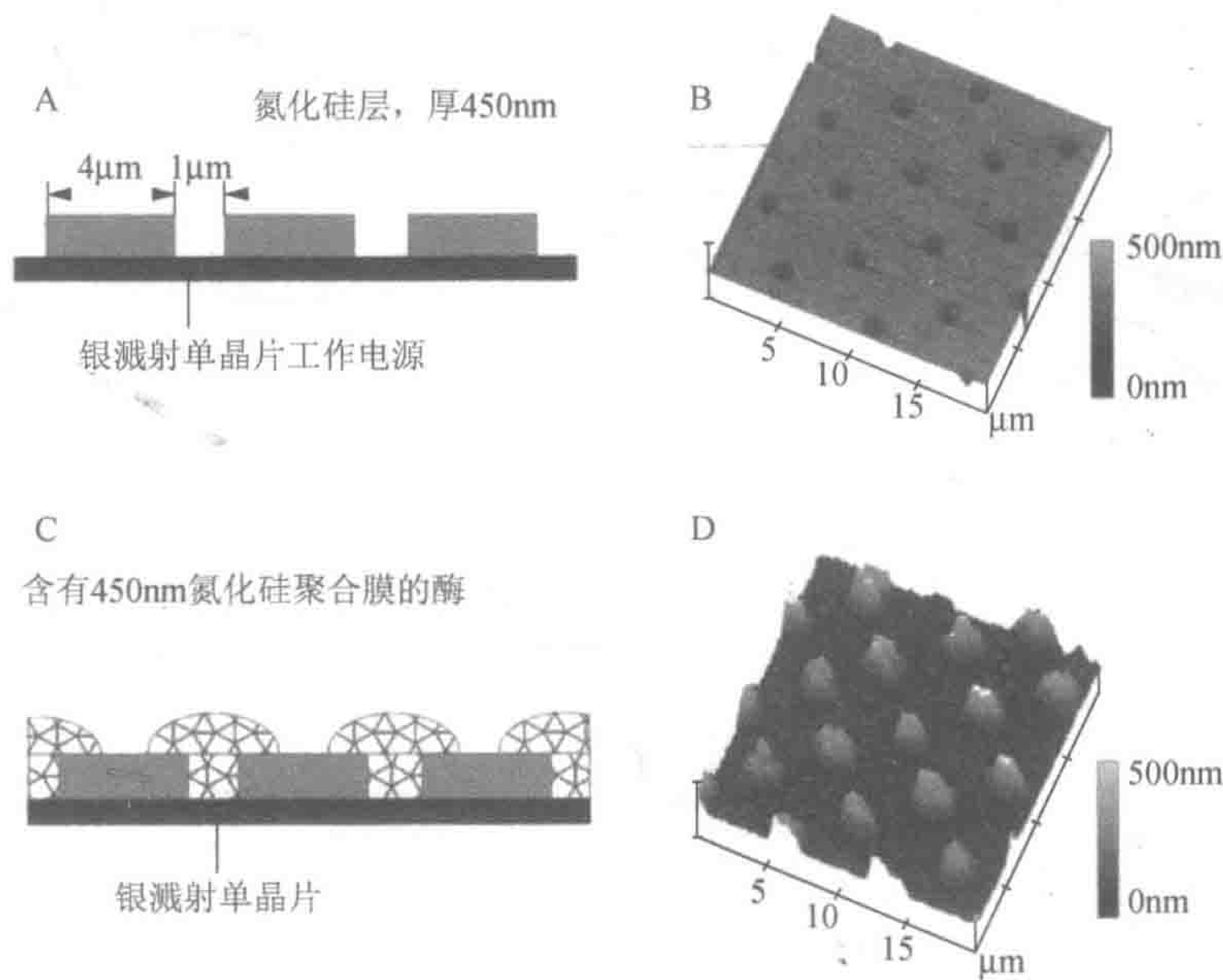


图 18.3　含酶聚合膜沉淀之前（A，B）和沉淀后（C，D）样品和相应的原子力显微镜接触模式示意图

以电化学沉积基于 pH 转移-诱导沉淀，含有葡萄糖氧化酶聚合物膜（图 18.3A，B）[22]。将含有葡萄糖氧化酶（5mg/ml 水）的溶液和保护聚合物悬浮液（70μl/ml 的水），使用之

前 4℃下至少储存 30min。三电极的设置，使用氧化银线作为 Ag 参考电极、铂金导线作为辅助电极和微模式导电金层作为工作电极。用存在于溶液中的酶形成聚合膜，测定电压脉冲轮廓（2200mV 0.2s、800mV 1s、0mV 5s 对 Ag 参考电极）12 次，从而导致聚合物沉淀到截留的酶孔中。样品用水和磷酸缓冲液漂洗，在 AFM-SECM 分析之前至少 4℃储存 12h。

18.3.3　酶活性的同时形貌和电化学成像

18.3.3.1～18.3.3.4 节中介绍了酶活性的 AFM-SECM 成像实验设置和参数。包括仪器的说明、AFM 轻敲模式参数的选择及同时电化学成像参数。

18.3.3.1　仪器：实验设置

修饰探头装入 Nanoscope Ⅲ，用于进液口与配置铂丝反电极及 AgQRef 氧化的银线的出口装备轻敲模式的流体池。由固定在流体单元格的悬臂上的金弹簧提供综合电极的电接触。金弹簧被压成悬臂卡口末端金层的小区域。用针或有锋利尖末端的镊子机械地刮绝缘层打开接触窗口。接触后，用精细毛刷涂上绝缘清漆以保护悬臂卡口。

实验设置的概述如图 18.4 所示。电化学实验通过双恒电位控制，以及读取电化学信号进入由常规的原子力显微镜提供额外 AFM 仪的 AD 通道（见 18.4 节注意事项 5）。因此，用综合电极测定的电流，可能直接与改造的原子力显微镜探针获得的表面信息相关。

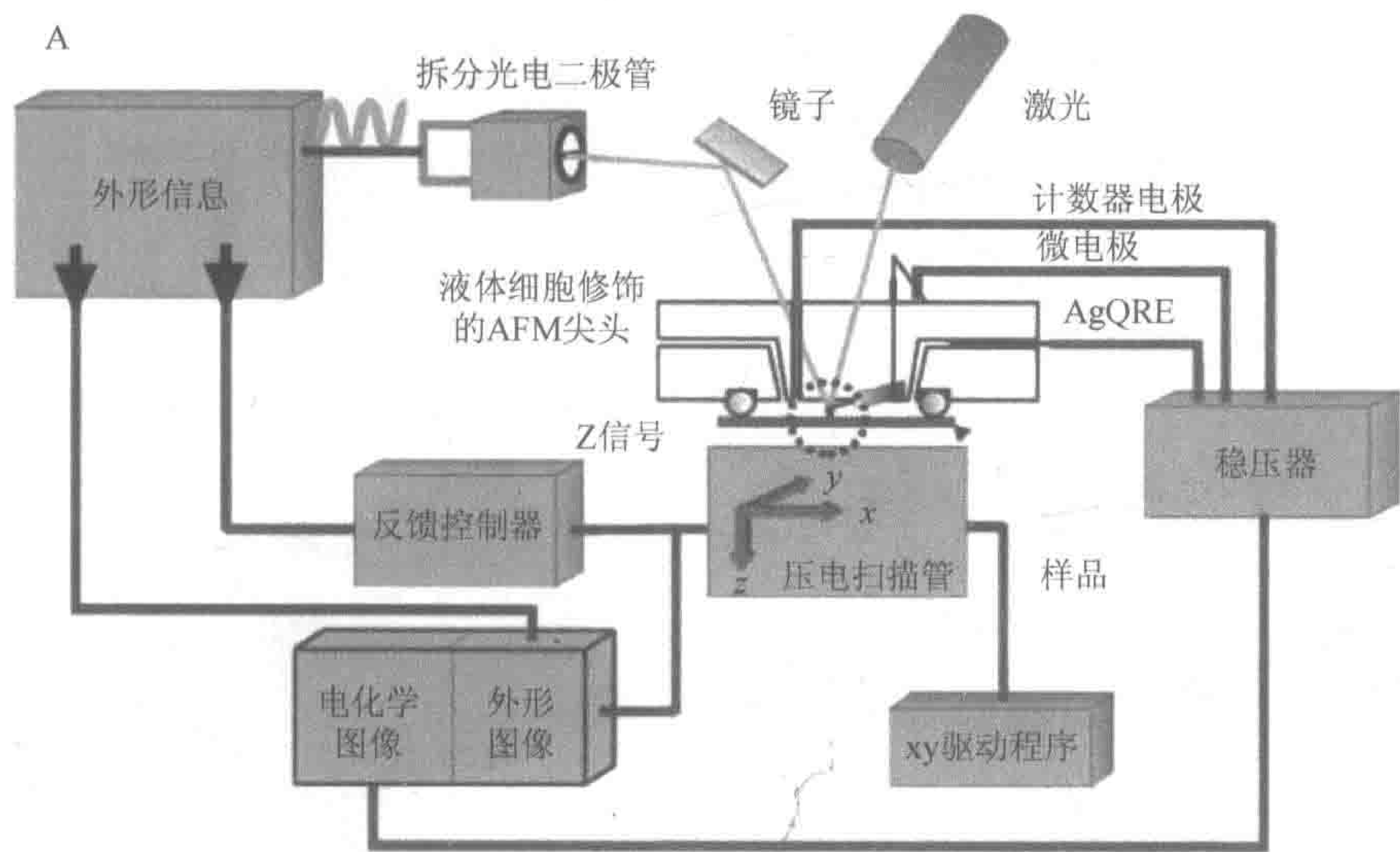


图 18.4　（A）实验装置和（B）AFM-SECM 同时成像及在微型样品表面参与综合电极代回收模式下运行的方案

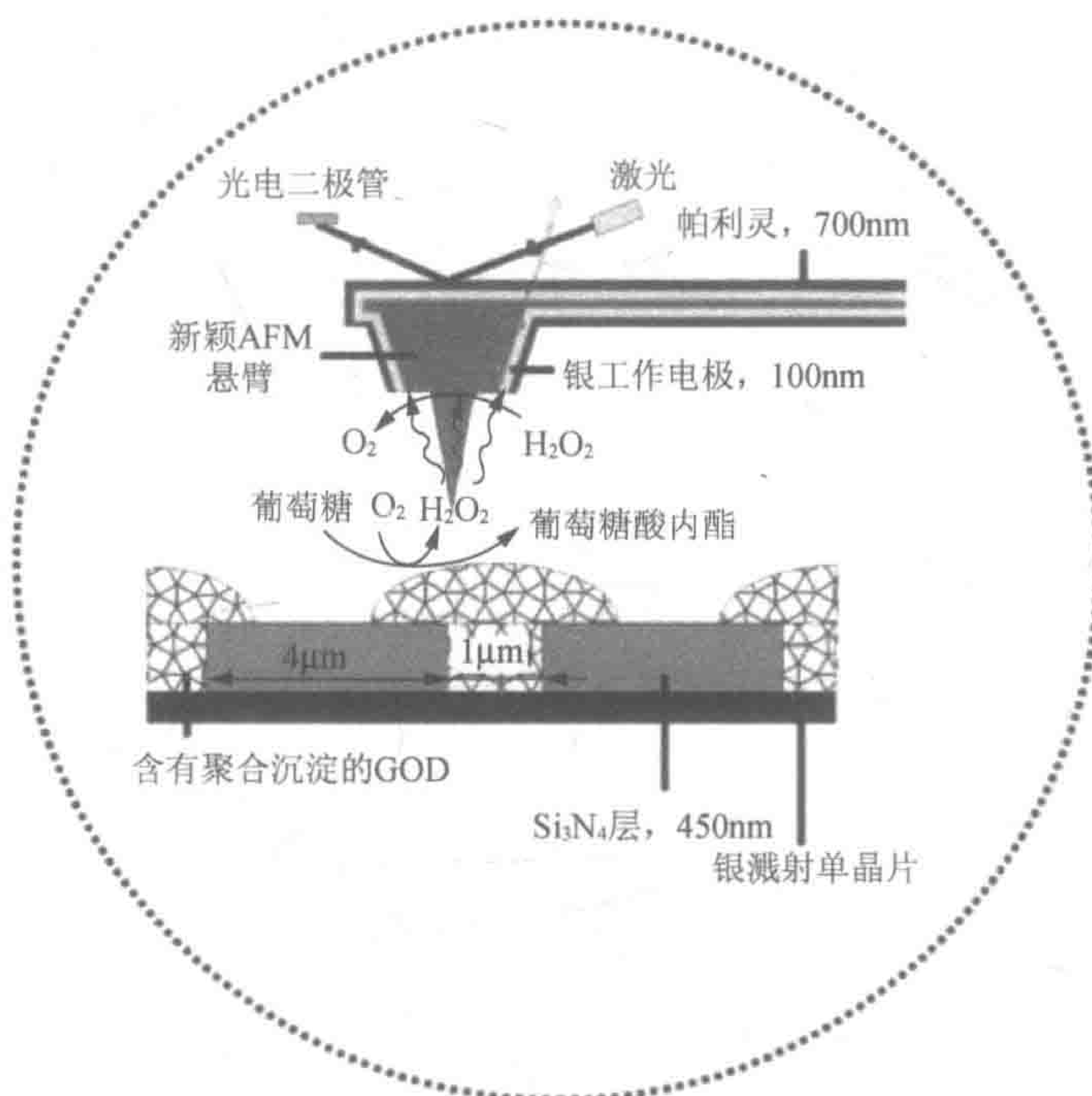


图 18.4　（续）

18.3.3.2　轻敲模式成像

酶活性的同时形貌和电化学成像，集成电极，对用气饱和磷酸缓冲液充满 DI AFM 轻敲模式液体池中样品表面扫描。AFM 轻敲模式作图参数，如下所示：

1）驱动频率：32.4V（见 18.4 节注意事项 6）。

2）驱动振幅：5V（见 18.4 节注意事项 7）。

3）扫描速率：2Hz（见 18.4 节注意事项 8）。

4）设置点：0.6V（见 18.4 节注意事项 9）。

5）采样率：256×256。

对每个测定积分增益和比例增益应该进行优化，以便图像高度展示出最鲜明的对照和振幅图像（误差信号）变化最小化。

18.3.3.3　电化学成像

SECM [23]的产生-收集模式已应用于葡萄糖氧化酶活性的定位检测。底物葡萄糖存在的情况下，产生的 H_2O_2 就是酶促反应的副产品。葡萄糖氧化酶催化葡萄糖成葡萄糖内酯，以及酶促反应电子受体氧减少形成 H_2O_2（图 18.4B）。用电流分析法以 750mV 对 AgQRef 恒电位，直接检测集成电极的 H_2O_2。图 18.4B 中显示了所涉及的反应和测量原理示意图。

电化学成像参数如下所示：

1）技术：电流分析法。

2）反电极：铂丝。

3）拟参比电极：氧化银线。

4）探头电位：750mV 对 AgQRef。

5）采样间隔：0.0025s。

6）液体：磷酸盐缓冲液（0.1mol/L，pH 7.0），空气达到饱和；添加 50mmol/L 葡萄糖作为阳性对照。

18.3.3.4　AFM-SECM 同时成像

为了确保探头表面和图像质量优化（见 18.3.3.1 节），显示聚合物点表面形貌特征。随后，将位点应用于集成电极并记录电流作为阴性对照图像（图 18.5A～C）。在缺乏葡萄糖溶液中，在含聚合物点的酶 AFM 轻敲模式成像过程中，电极记录的电流可以忽略不计和不呈现电化学特征（图 18.5C）。对酶活性成像，收回针尖，用含 50mmol/L 葡萄糖的磷酸盐缓冲液充满液体池。再次接入探头后重复扫描过程。在葡萄糖存在的情况下，探头针尖对含聚合物点的葡萄糖氧化酶横向扫描时，由于局部产生了 H_2O_2，使纳米微电极记录的电流增强（图 18.5F）。电化学图像模式的周期性与原子力显微镜探针提供表面形貌特征完全相一致。此外，阴性和阳性对照的形貌特征没有发生改变，但固定化的酶活性没有任何信息。

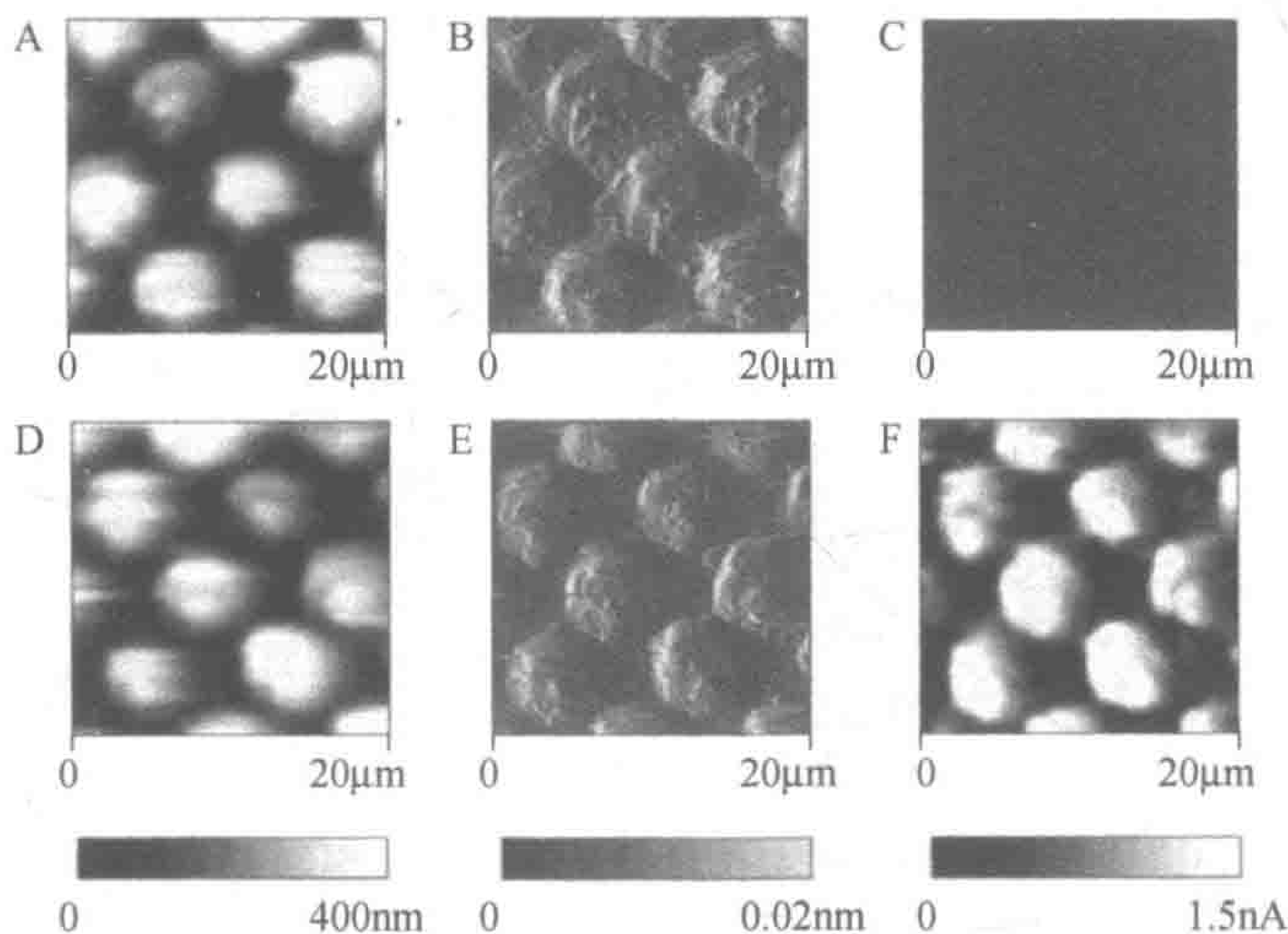


图 18.5　在原子力显微镜轻敲模式中同时记录葡萄糖氧化酶活性的高度和趋势图像具有 5V 自由驱动振幅和 32.4kHz 驱动频率。俯视高度(A、D)、相应振幅（B、E）和在饱和空气磷酸缓冲液（0.1mol/L，pH 7.4）中同时记录的趋势图像（C、F），在溶液中缺少底物葡萄糖（A～C）和存在葡萄糖（50mmol/L）时（D～F）显示的图像。探头保持 750mV 对 AgQRef 的潜力。电极边缘长度为 770nm；尖端高度为 700nm（转载自参考文献[14]并征得许可）

18.4　注 意 事 项

1．可选择，沉积 50nm 铂层作为一种电极材料（工作压力为 6mtorr；功率为 30W；氩气存在条件下）。高功率导致悬臂弯曲。

2．金属化悬臂还可以采用等离子体增强化学气相沉积法（PECVD）沉积 800nm 厚氮化硅层进行绝缘。可以实现致密和定义良好的隔热层，尤其是当这个过程重复几次时（6min×5min PECVD 沉积，产生约 800nm 氮化硅）[6]。

3．介绍的固定化方案，适用于许多其他蛋白质的固定化。例如，文献中报道了过氧化氢酶、乳酸氧化酶、依赖 NAD^+葡萄糖脱氢酶、依赖吡咯喹啉醌（PQQ）葡萄糖脱氢酶、醌血红蛋白乙醇脱氢酶和乙醇脱氢酶[22]。

4．从 Quantifoil 购买周期性微型硅片。任何微电极阵列都可用于此目的。

5．数字仪表提供的相位盒可阅读 4 个附加信号以上。

6．不管是 100nm 金的沉积还是 700nm 的聚对二甲苯 C，初始氮化硅悬臂的性能与未修饰的氮化硅悬臂相比几乎保持不变[9]。不管怎么说，对不同样品、流体、液体体积和悬臂，最理想的驱动频率变化，必须按操作说明用手工选择驱动频率。最佳的频率似乎出现在峰值边上或峰之间的浅谷。修饰悬臂的典型频谱如图 18.6 所示。区域循环显示，典型操作频率产生良好的流体轻敲图像。

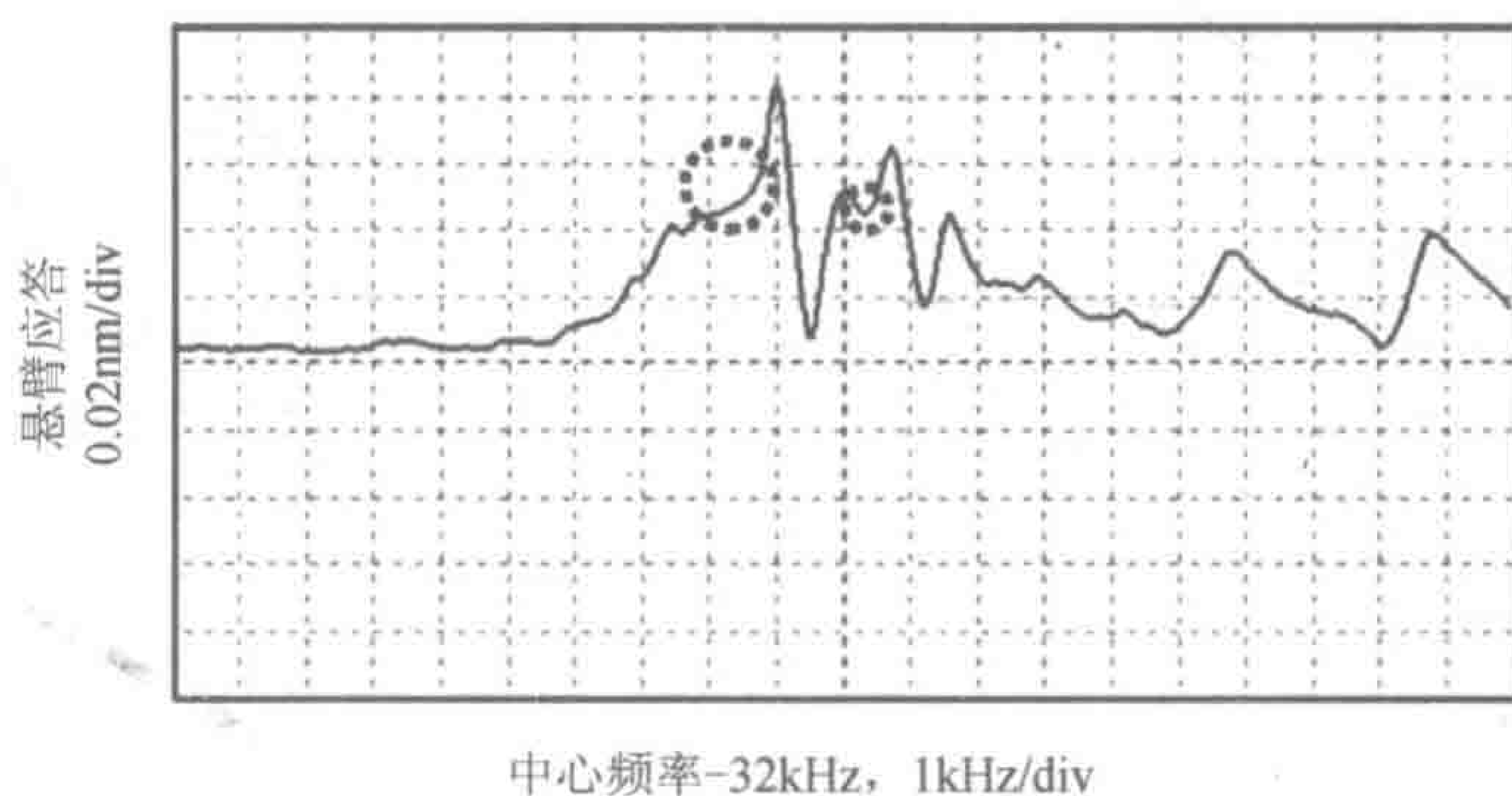


图 18.6　涂有 100nm 金和 700nm 聚对二甲苯 C 绝缘的修饰悬臂的光谱频率

7．将驱动振幅调整到获得悬臂响应要求的振幅。由于样品在高振幅具有小变化，通常需要 2～5V 驱动振幅。如果必须用 10V 以上的驱动振幅，柔性样品通常很难得到好的结果。

8．一般情况下，1Hz 或更低的低扫描速率是有利的以避免对流的影响。

9．通过监测图像质量调整设定点。以小的增量增加设置点直到悬臂拉出表面为止。然后以小的增量减小设定点直到图像出现和优化为止。通常获得最好的图像是在刚刚低于图像显示时的设定点。

致谢

本项工作获得了美国国家科学基金会（环境中生物复杂性项目 0216368）、美国国立卫生研究所（EB00058）和奥地利科学研究基金促进会（P14122-CHE 和 J2230）的资助。

参考文献

[1] Binnig, G., Quate, C.F., and Gerber, C. (1986) Atomic force microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 56, 930–933.

[2] Liu, H. Y., Fan, F.-R. F., Lin, C. W., and Bard, A. J. (1986) Scanning electro- chemical and tunneling ultramicroelectrode microscope for high-resolution examination of electrode surfaces in solution. *J. Am. Chem. Soc.* 108, 3838, 3839.

[3] Engstrom, R. C., Weber, M., Wunder, D. J., Burgess, R., and Winquist, S. (1986) Measurements within the diffusion layer using a microelectrode probe. *Anal. Chem.* 58, 844–848.

[4] Kwak, J. and Bard, A. J. (1989) Scanning electrochemical microscopy: theory of the feedback mode. *Anal. Chem.* 61, 1221–1227.

[5] Gardner, C.E. and Macpherson, J.V. (2002) Atomic forc emicroscopy probes go electrochemical. *Anal. Chem.* 74, 576A–584A.

[6] Kranz, C., Friedbacher, G., Mizaikoff, B., Lugstein, A., Smoliner, J., and Bertagnolli, E. (2001) Integrating an ultramicroelectrode in an AFM cantilever: combined technology for enhanced information. *Anal. Chem.* 73, 2491–2500.

[7] Krantz, C., Mizaikoff, B., Lugstein, A., and Bertagnolli, E. (2002) Integrating an ultramicroelectrode in an AFM cantileuer: toward the development of combined microsensing imaging tools: in Environmental Electrochemistry Analysis of Trace Element Biogeochemistry (Taillefert, M. and Rozan, T. F., eds.), American Chemical Society, Washington, DC, pp. 320–333.

[8] Lugstein, A., Bertagnolli, E., Kranz, C., Kueng, A., and Mizaikoff, B. (2002) Integrating micro- and nanoelectrodes into atomic force microscopy cantilevers using focused ion beam techniques. *Appl. Phys. Lett.* 81, 349–351.

[9] Kueng, A., Kranz, C., Mizaikoff, B., Lugstein, A., and Bertagnolli, E. (2003) Combined scanning electrochemical atomic force microscopy for tapping mode imaging. *Appl. Phys. Lett.* 82, 1592–1594.

[10] Hansma, P. K., Cleveland, J. P., Radmacher, M., et al. (1994) Tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Appl. Phys. Lett.* 64, 1738–1740.

[11] Putman, C. A. J., van der Werf, K. O., De Grooth, B. G., Van Hulst, N. F., and Greve, J. (1994) Tapping mode atomic force microscopy in liquid. *Appl. Phys. Lett.* 64, 2454–2456.

[12] Le Grimellec, C., Giocondi, M. C., Pujol, R., and Lesniewska, E. (2000) Tapping mode atomic force microscopy allows the in situ imaging of fragile membrane structures and of intact cell surfaces at high resolution. *Single Molecules* 1, 105–107.

[13] Knoll, A., Magerle, R., and Krausch, G. (2001) Tapping mode atomic force microscopy on polymers: where is the true sample surface? *Macromolecules* 34, 4159–4165.

[14] Kueng, A., Kranz, C., Lugstein, A., Bertagnolli, E., and Mizaikoff, B. (2003) Integrated AFM-SECM in tapping mode: simultaneous topographical and electrochemical imaging of enzyme activity. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 3237–3240.

[15] Kueng, A., Kranz, C., and Mizaikoff, B. (2003) Scanning probe microscopy with integrated biosensors. *Sens. Lett.* 1, 2–15.

[16] Kueng, A., Kranz, C., and Mizaikoff, B. (2004) Amperometric ATP-biosensor based on polymer entrapped enzymes. *Biosens. Bioelectron.* 19, 1301–1307.

[17] Kranz, C., Kueng, A., Lugstein, A., Bertagnolli, E., and Mizaikoff, B. (2004) Mapping of enzyme activity by detection of enzymatic products during AFM imaging with integrated SECM-AFM probes. *Ultramicroscopy* 100, 127–134.

[18] Heintz, E.- L. H., Kranz, C., Mizaikoff, B., Noh, H.-S., Hesketh, P., Lugstein, A., and Bertagnolli, E. (2001) Characterization of parylene coated combined scanning probe tips for in-situ electrochemical and topographical imaging, in *Proceedings of the IEEE Nanotechnology Conference*.

[19] Lee, Y., Amemya, S., and Bard, A. J. (2001) Scanning electrochemical microscopy. 41. Theory and characterization of ring electrodes. *Anal. Chem.* 73, 2261– 2267.

[20] Smythe, W. R. (1951) The capacitance of a circular annulus. *J. Appl. Phys.* 22, 1499–1501.

[21] Szabo, A. J. (1987) Theory of current at microelectrodes: application to ring electrodes. *J. Phys. Chem.* 91, 3108–3111.

[22] Kurzawa, C., Hengstenberg, A., and Schuhmann, W. (2002) Immobilization method for the preparation of biosensors based on pH shift-induced deposition of biomolecule-containing polymer films. *Anal. Chem.* 74, 355–361.

[23] Wittstock, G. (2001) Modification and characterization of artificially patterned enzymatically active surfaces by scanning electrochemical microscopy. *Fresenius* J. Anal. Chem. 370, 303–315.

第 19 章　蛋白淀粉样错误折叠
——机制、诊断和病理意义

Nigil Satish Jeyashekar, Ajit Sadana, Tuan Vo-Dinh

概　　述

由于机体细胞外间隙沉淀的蛋白质错误折叠而产生各种疾病。这些沉淀可以是无定形的（无序），也可以纤维状的（有序）。包涵体是无定形聚集的一个实例，淀粉样纤维是纤维状或有序聚集的例子。在这一章，我们讨论由原纤化聚合沉积或淀粉样纤维，称为淀粉样变性引起的疾病类型。我们还综述不同的蛋白质错误折叠形成淀粉样纤维的机制。从不同蛋白质形成的每个淀粉样纤维，通过影响体内不同器官导致不同的疾病。然而，不同淀粉样纤维特性即结构和形态，在电镜下观察和 X 射线衍射观察到的纤维与天然蛋白质完全相同。我们目前开发了消除淀粉样蛋白纤维化形成的治疗策略。由于淀粉样原纤维相似特性，这些策略可能可以避免淀粉样纤维引起的一类致命疾病。

关键词：淀粉样蛋白纤维的形成；蛋白质折叠；甲状腺素运输蛋白；溶菌酶；免疫球蛋白；阿尔茨海默病；朊病毒

19.1　导　　论

借助于从线性的非活动状态（其编码的信息含在氨基酸序列中），获得蛋白质需要的天然和活性结构的蛋白质折叠，是生物学的首要问题。在折叠过程中，某些蛋白质没有获得天然和活性状态而沉淀为不溶性的“团块”。在人体内各种器官细胞外间隙不溶性物质的沉淀，导致致命疾病，最初导致器官功能衰竭和最终导致器官死亡。沉淀可能要么是无定形的聚集体，如包涵体或无序的聚集体，要么是原纤维聚集体，如淀粉样纤维。由于淀粉样纤维沉积引起的疾病称为淀粉样变性。错误折叠形成淀粉样纤维的前体蛋白称为淀粉样降解（amyloidogenic）蛋白。

由于错误折叠形成交联 β 纤维成分，已经鉴定了 16 个不同淀粉样降解蛋白。它们导致不同的临床综合征[1,2]。最常见的包括阿尔茨海默病和传染性海绵状脑病（TSE）、朊病毒疾病如牛海绵状脑病或疯牛病[受污染的肉类消费导致人类克罗伊茨费尔特-雅各布（早老年痴呆症，译者注），在奶牛中称为疯牛病]。如包括热休克蛋白、groEL、hsp60 家族和 hsp90 家族的伴随的分子伴侣是蛋白质，这些分子伴侣帮助蛋白质正确装配、折叠，有助于实现蛋白质的原生状态。通过蛋白质降解去除多余的未折叠的蛋白质与错误折叠的

蛋白质。这是质量控制机制。形成的淀粉样纤维克服所有的分子伴侣介导的折叠和沉淀于人体内细胞外间隙的降解机制，导致致命的疾病。

这一章回顾前体蛋白形成淀粉样纤维的不同机制。如从刚果红染色观察到电镜和 X 射线纤维衍射数据，描述不同淀粉样降解蛋白形成的淀粉样纤维，均有相似的结构和形态特征。本文综述了抑制或消除不同前体蛋白纤维形成的治疗策略。这些策略包括外科基因疗法、基因工程、人工分子伴侣和稳定配体。开发了消除纤维形成的治疗策略。由于这些类型的疾病有类似特征，这些纤维可能导致临床上致命的疾病类型，如淀粉样变性。

19.2　淀粉样蛋白纤维形成的机制

蛋白质聚集的基本模型如图 19.1 所示。通过中间体未折叠蛋白质形成天然形式，有序聚集（淀粉样纤维）和无固定形态聚集（包括聚集体）。人们认为中间体是构建元件，这样的元件通过疏水性面分子间相互作用形成原生状态[3]。当以分子间方式进行疏水表面相互作用和这种中间体形式大聚集体三维（3D）聚类时就形成了聚集体。聚集体沉淀一度超越了溶解度极限。中间体易于聚集是因为他们有大片相邻表面的疏水性。在最终折叠状态结构内疏水表面相对密封。

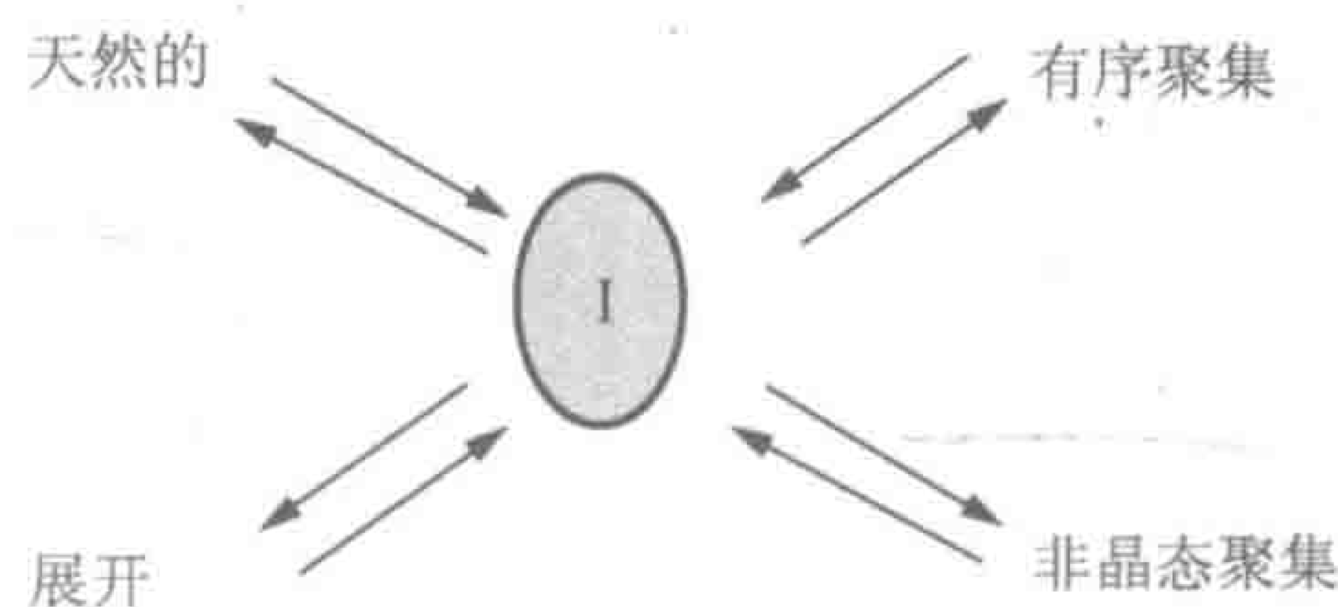


图 19.1　蛋白质折叠的基本机制[3]

19.2.1　聚集的概念

蛋白质折叠的各个阶段可能发生在单一的流体介质中或一系列区划的液体介质中。在这两种情况下，大分子占据流体总量的很大一部分。这种流体介质一般统称为“聚集”，而不是浓缩，因为大分子不可能以高浓度存在[4,5]。聚集会提高淀粉样聚集体形成的速率与平衡常数。蛋白质折叠中存在竞争步骤以防止淀粉样纤维的形成。尽管如此，过度聚集的持续将加强任何预先存在的部分未折叠蛋白质形成淀粉样和（或）包涵体[4]。

19.2.2　构象变化假说

构象变化假说表明三级结构的变化，在部分变性的条件下，1/16 个正常的可溶性和有用的人蛋白质转换成替代构象。这种替代的构象随后经过自组装形成淀粉样纤维。这就是淀粉样疾病假设的病原体[6]。

19.2.3 纤维特性

淀粉样蛋白纤维化是指体内的过程，其中 1/16 人淀粉样病变异常蛋白质自组装成 60～100Å 可变宽度和长度的纤维。淀粉样蛋白斑具有三个特征[3]：用刚果红染色的双折射特征、电子显微镜观察的纤维形态和与众不同的与高度β-折叠量一致的 X 射线纤维衍射型。

淀粉样纤维通常有 7～12nm 直径和可被高浓度变性剂解离。纤维衍射研究表明，淀粉样纤维的核心结构是一个跨β结构，涉及β链垂直于纤维的轴运行。这些链相互作用形成它们的面与纤维轴平行的β-折叠[3]。每个淀粉样纤维由一束纤维组成“原丝”。每个原丝就是细胞质的微管，拥有外径 25nm 和厚 5nm 的壁，以螺旋包装并与各种蛋白质相连。根据蛋白质或多肽，4～5 个原丝缠绕在一起形成直径约 10nm 的纤维[3]。

形成淀粉样蛋白的能力是多肽链的通用属性。前体浓度的增加和随后的淀粉样构象可能会带来突变和翻译后的不当修饰[4]。在老年人中，淀粉样疾病发病率增加，可能是在老化组织细胞中，胞内总蛋白质聚集浓度（相当于细胞水分含量下降）增加的直接后果。这是随着年龄进程脑和肝细胞水分减少的有力证明[4]。淀粉样纤维显然是一种惰性、不溶性、胞外的主要蛋白质聚合物，它杀死细胞但没有组织坏死而通过激活细胞凋亡的机制[6]。

虽然有 16 个不同淀粉样降解前体蛋白质参与淀粉样纤维的形成，但 19.3 节讨论蛋白质的功能、折叠机制和临床上重要的甲状腺素视黄质运载蛋白（TTR）、免疫球蛋白、参与阿尔茨海默病的β肽、溶菌酶及朊病毒。此外论述β2 微球蛋白和载脂蛋白的几个特征。

19.3 临床上参与阿尔茨海默病的重要蛋白质

19.3.1 甲状腺素视黄质运载蛋白

甲状腺素视黄质运载蛋白（transthyretin，TTR）涉及两种淀粉样疾病：家族性淀粉样多发性神经病（FAP）和老年性系统性淀粉样变性。在低 pH 填充的部分折叠的单体中间体涉及体外从 TTR 形成淀粉样蛋白[3]。

TTR 通过直接结合运输甲状腺素和通过与视黄醇蛋白的结合，间接运输视黄醇。在某些个体中，野生型（WT）TTR 突变体转换为淀粉样物质，可能会导致 80 岁左右老年人系统性淀粉样变性。这种类型的淀粉样蛋白的特点是在心脏大量淀粉样沉积，导致充血性心力衰竭。或者 1/54 的 TTR 突变体系统沉积，因为淀粉样蛋白可能会导致外周神经病变或器官功能障碍。通常有很多早期发病病例。这些疾病被广泛称为家族性淀粉样多发性神经病（FAP）[7]。FAP 突变通过破坏天然蛋白质折叠结构的稳定呈现其功能，并且在中度变性条件下，使淀粉样原性中间体更容易受到折叠状态的影响。

这些突变不会改变自然折叠的结构。不稳定增加了单体淀粉样降解中间体的稳态浓度。反过来，增加大量淀粉样蛋白的形成，从而降低疾病发病年龄[1]。淀粉样降解中间体经历自组装成几种四级结构，这些结构在TTR生理浓度条件时导致TTR形成淀粉样纤维[8]。机制如图 19.1 所示。

变异性 FAP 变性成淀粉样降解中间体的速度，远远快于野生型 TTR。这有利于淀粉样原性中间体浓度的增加，从而易感个体拥有纤维形成和疾病的这些突变体。FAP 变异型淀粉样降解中间体形成率的增加可能特别重要，因为 TTR 居留在溶酶体中（淀粉样蛋白转换加工可能的细胞外位点）持续时间相对较短。自组装过程可能不是有核的凝聚聚合反应，但是相反，似乎不断增加四级结构自组装的复杂性[7]。

淀粉样纤维衍生 TTR 突变型的高分辨率模式与交联β结构一致，出现了 115Å 的新重复。图 19.2 和图 19.3 呈现了高分辨率电子显微图和 TTR 淀粉样纤维 X 射线纤维衍射图。这可以解释为，形成轴平行于纤维轴的β-折叠，完整螺旋转角的 24 个β链重复单元[3]。目前，甲状腺素结合位点似乎呈现最有前途的负责纤维形成的构象变化药理抑制靶点。此外，氟灭酸和双氯芬酸钠[9]作为纤维形成功能强大的抑制剂[8]。

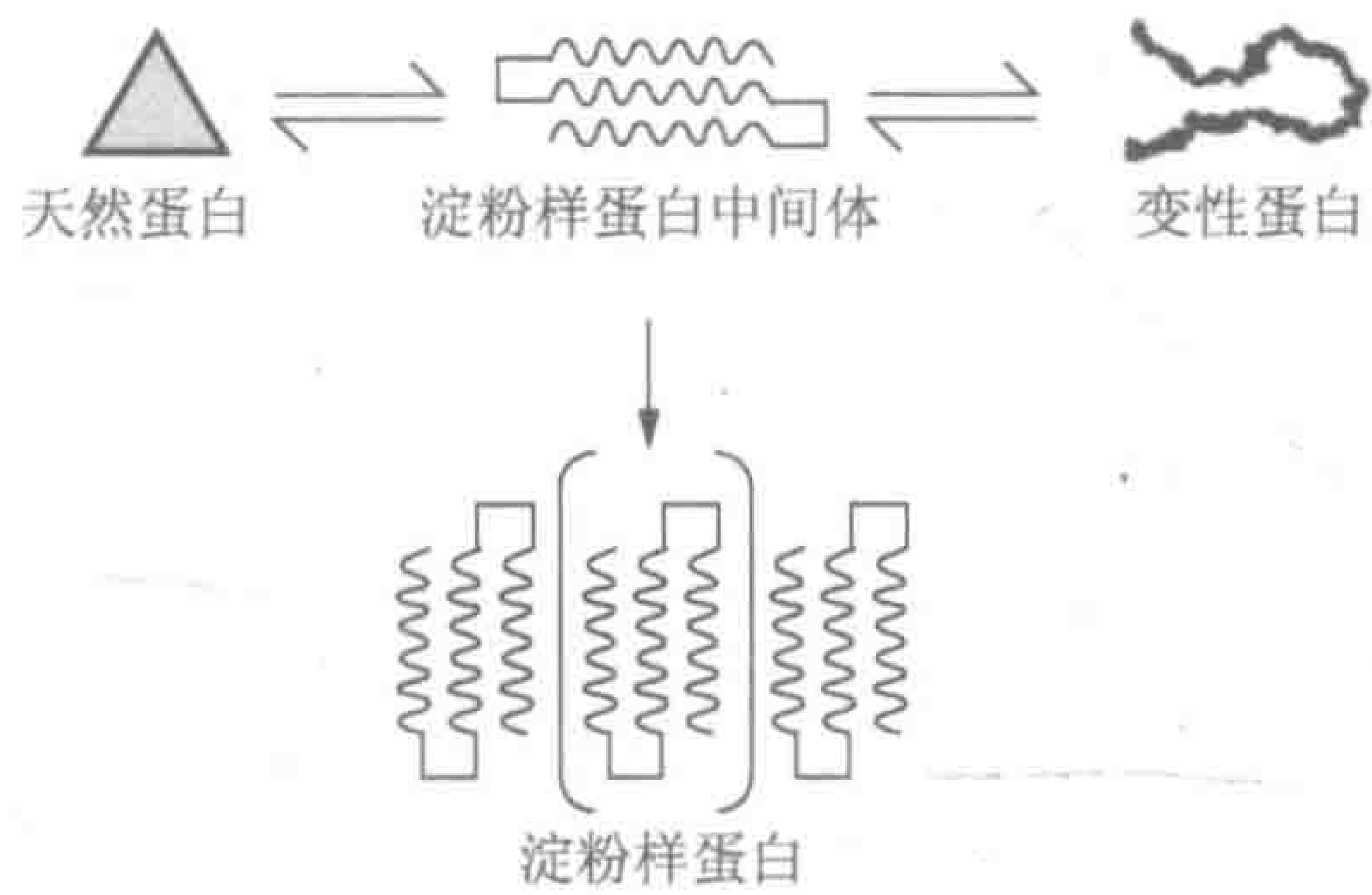


图 19.2 TTR 错误折叠形成淀粉样的机制 [1]

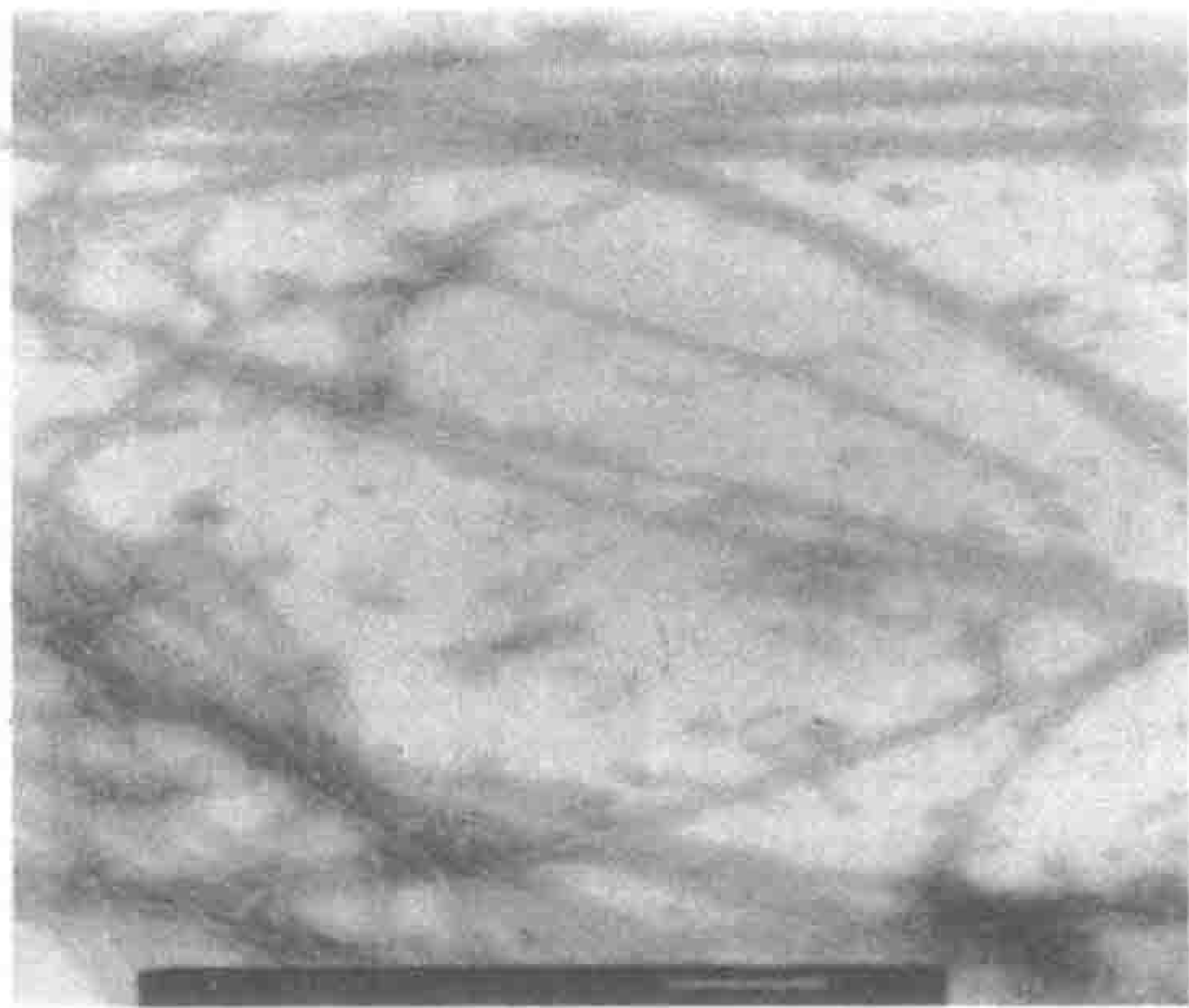


图 19.3 TTR 淀粉样纤维电子显微照片[11]

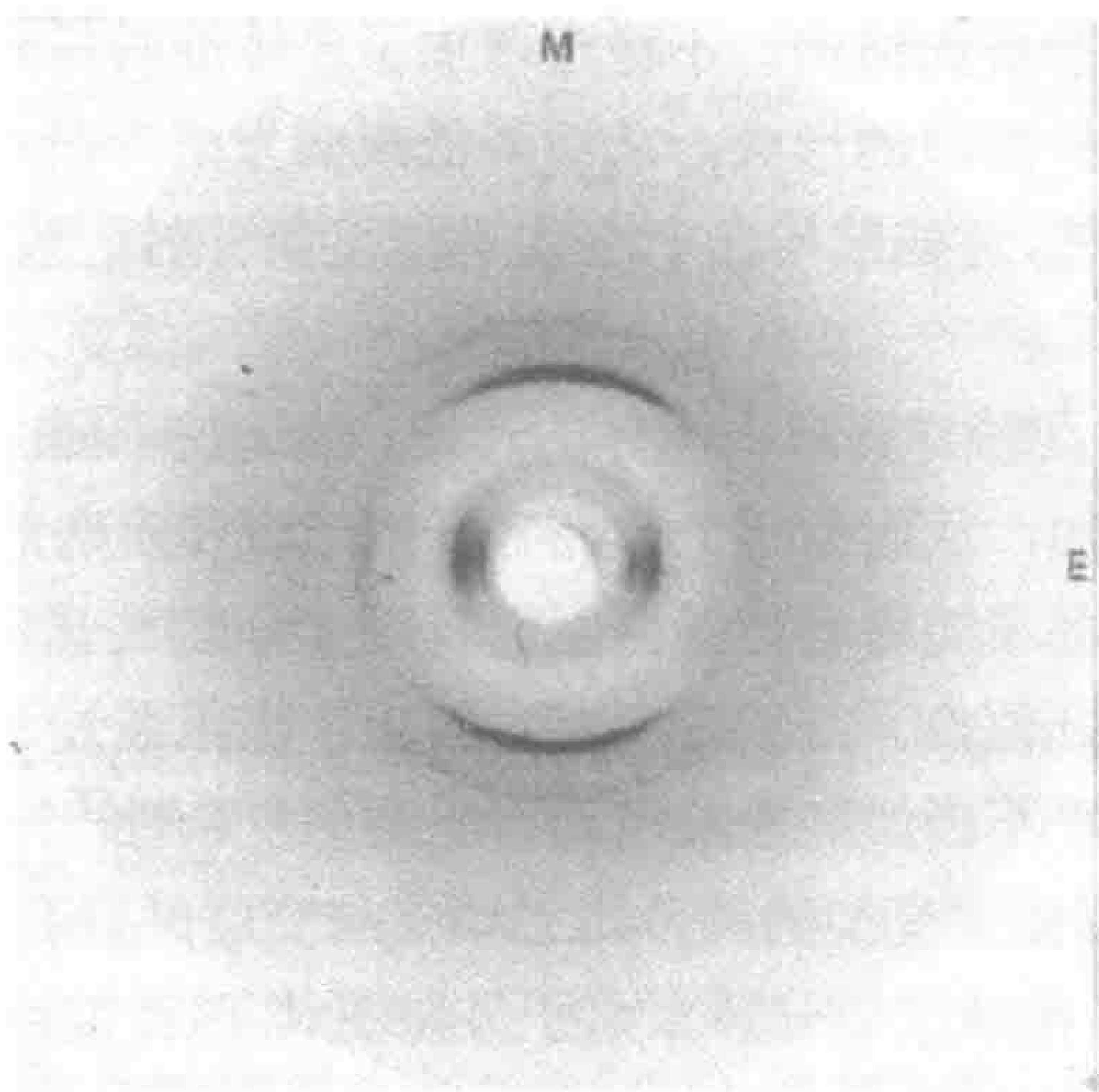


图 19.4　TTR 淀粉样纤维 X 射线纤维衍射图[9]。M 代表子午反射；E 表示赤道的反射

19.3.2　溶菌酶

已知溶菌酶通过水解细菌细胞壁有防治细菌感染的作用。通过与底物结合，溶菌酶催化 *N*-乙酰基葡糖胺和 *N*-乙酰胞壁酸β(1-4)连接单位合成的聚合物和天然形式的水解[8]。溶菌酶合成发生在所有的人体组织内。该蛋白质存在于所有生物体液中，从眼泪到血浆，而主要存在于中性粒细胞、白细胞和单核细胞中。血浆中的溶菌酶通过肾脏过滤可迅速除去，并且计算出，在 1h 内可将约 76%的血浆溶菌酶排泄到尿中。对溶菌酶分布数据分析表明，有放射性标记溶菌酶在肝和脾中的合成和组织定位之间有一定的差异。但是，这两个器官都能够循环利用高达 25%以上的酶。这表明循环溶菌酶生理上由肝和脾结构来吸收。请注意，这两个器官都积极参与这种类型的淀粉样变性。

人溶菌酶有两个天然存在的突变体，Ile56Thr 和 Asp67His，已经发现它们是淀粉降解，明显引起遗传性非神经病理性的系统性淀粉样变性。两种突变体比野生型蛋白更不稳定，并在 37℃填充了部分折叠中间体，它被推定为淀粉样蛋白[1,3]的前体。这两种蛋白质有单氨基酸突变，要么 56 位置处异亮氨酸突变为苏氨酸，要么 67 位天冬氨酸突变为组氨酸[8]。不像 TTR 淀粉样变性，野生型溶菌酶没有淀粉样蛋白原纤维形成的能力[7]。在两个已知与疾病相关的人溶菌酶突变体的情况下，在低 pH 或在稍微升高的温度条件下，最容易形成原纤维[10]。降低蛋白质的稳定性，而不是改变折叠动力学是两种突变体的共同特征。天然状态的低稳定性，导致部分折叠状态的集聚，这是与野生型蛋白折叠途径上，主要中间体的聚集非常相似[10]。

中间体不折叠区域主要是在蛋白质的β结构域。这表明，聚集过程可能起始于β链分子间的结合，包括天然结构中分子间的相互作用[10]。人溶菌酶中两个淀粉样降解突变体的关键，显然在于它们在α和β结构域之间的界面产生的效果。残基 56 充当β域在α域上的锚定[11]。溶菌酶主要部分天然状态的形成与直接折叠过程相比比较迟钝。瞬时聚集部分结构化中间体似乎是构象动力学的陷阱，只能慢慢达到天然状态[12]。中间体的稳定性，

而不是平衡不稳定，是人溶菌酶[13,14]淀粉样变性的关键因素。溶菌酶淀粉样蛋白聚集的机制如图 19.5 所示[13]。

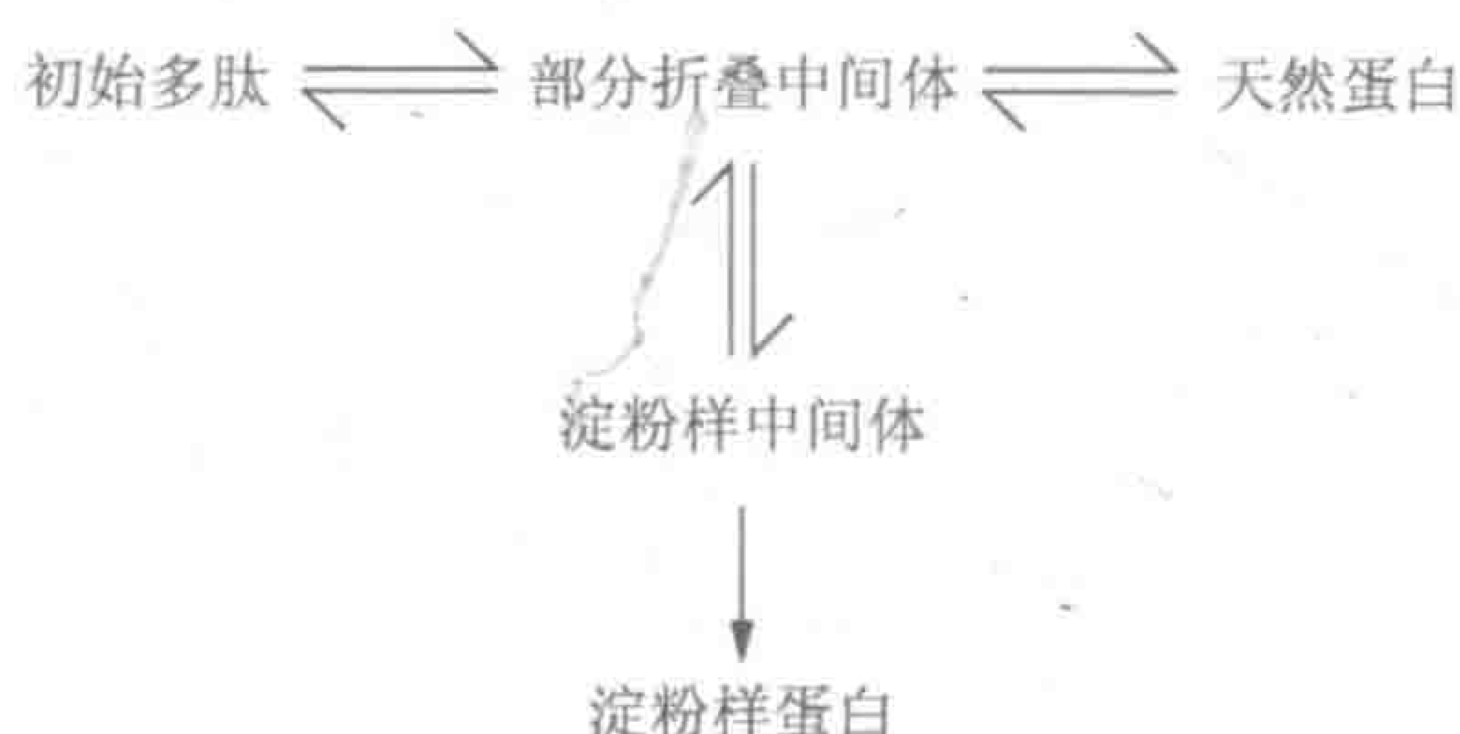


图 19.5 溶菌酶折叠机制和淀粉样纤维的形成

19.3.3 免疫球蛋白

大约在 10%的个体经历单克隆轻链过量产生中观察到轻链淀粉样变性。通常在 5 年内导致外周神经系统的障碍，器官功能障碍和死亡。在酸性和部分变性条件下，免疫球蛋白（Ig）轻链转化成淀粉样蛋白，至少一种构象中间体加工一些轻链，但不是全部变得易感。结构域稳定性与淀粉样蛋白纤维形成程度成反比。它不是天然状态而是构象中间体致使蛋白质形成淀粉样原纤维[1]。

还观察到导致淀粉样蛋白原纤维，在 TTR 中形成的一些突变体、溶菌酶和免疫球蛋白可变轻链（V_L）结构域，导致天然状态的稳定性下降。在这样的情况下，天然构象与导致聚集构象群的聚集中间体构象相比存在不稳定性差异[3]。

19.3.4 Aβ淀粉样肽和阿尔茨海默病

导致痴呆和最终死亡的阿尔茨海默病（Alzheimer's disease，AD），体现脑组织[15]死亡和失活神经包围淀粉样蛋白原纤维存在的特征。原纤维的主要成分是β淀粉样肽，已知序列但未知功能的 39～43 残基肽，发现它们存在于正常人组织中，并由较大的蛋白前体[1,8]衍生。Aβ淀粉样多肽是由β和 γ 分泌酶产生的两个截然不同的蛋白质水解反应所产生。Aβ沉淀可引起神经毒性，突触前末端的损失和营养障碍神经炎发生。毒性程度依赖于聚集的水平[8]。Aβ采用可溶态亚稳结构，很可能在淀粉样蛋白形成中间体中变成更多结构。事实上，Aβ-螺旋结构的装配可驱动二级和四级β-折叠结构的增加[7]。在某一 Aβ临界浓度形成 Aβ微胶粒。纤丝在这些微胶粒内成核，这些原纤维通过单体与原纤维末端的不可逆结合而生长[7]。

天然的、可溶的和折叠状态与β(25-35)淀粉样蛋白（图 19.7 步骤 1）相互作用。淀粉样蛋白复合形成聚集体和沉淀（图 19.7 步骤 2）。在某些情况下，淀粉样蛋白施加一个力，以展开淀粉样蛋白原纤维表面上的蛋白质（图 19.7 步骤 3）。折叠或部分折叠状态具有较强的聚集倾向。这导致无定形的聚集体强烈黏附于淀粉样蛋白原纤维的表面上，并进行无法挽回的沉积。β(25-35)淀粉样蛋白与天然蛋白质构象相互作用并破坏其天然构象。这导致病理聚集体的形成。β(25-35)淀粉样蛋白的作用与分子伴侣的作用完全相反，这有助

于蛋白质正确折叠。因此，β(25-35)被称为"反分子伴侣"[16]。纤维状 Aβ沉积在脑血管，从而有效定位和增强淀粉样β蛋白前体（AβPP）抗凝血功能。这就促成了导致大出血[17]的微环境。某些化合物，如刚果红、蒽环类和利福平可以合适地与原纤维结合，而无需修改其整体结构，消除它们的细胞毒力，有力证明了有效治疗策略[6]。

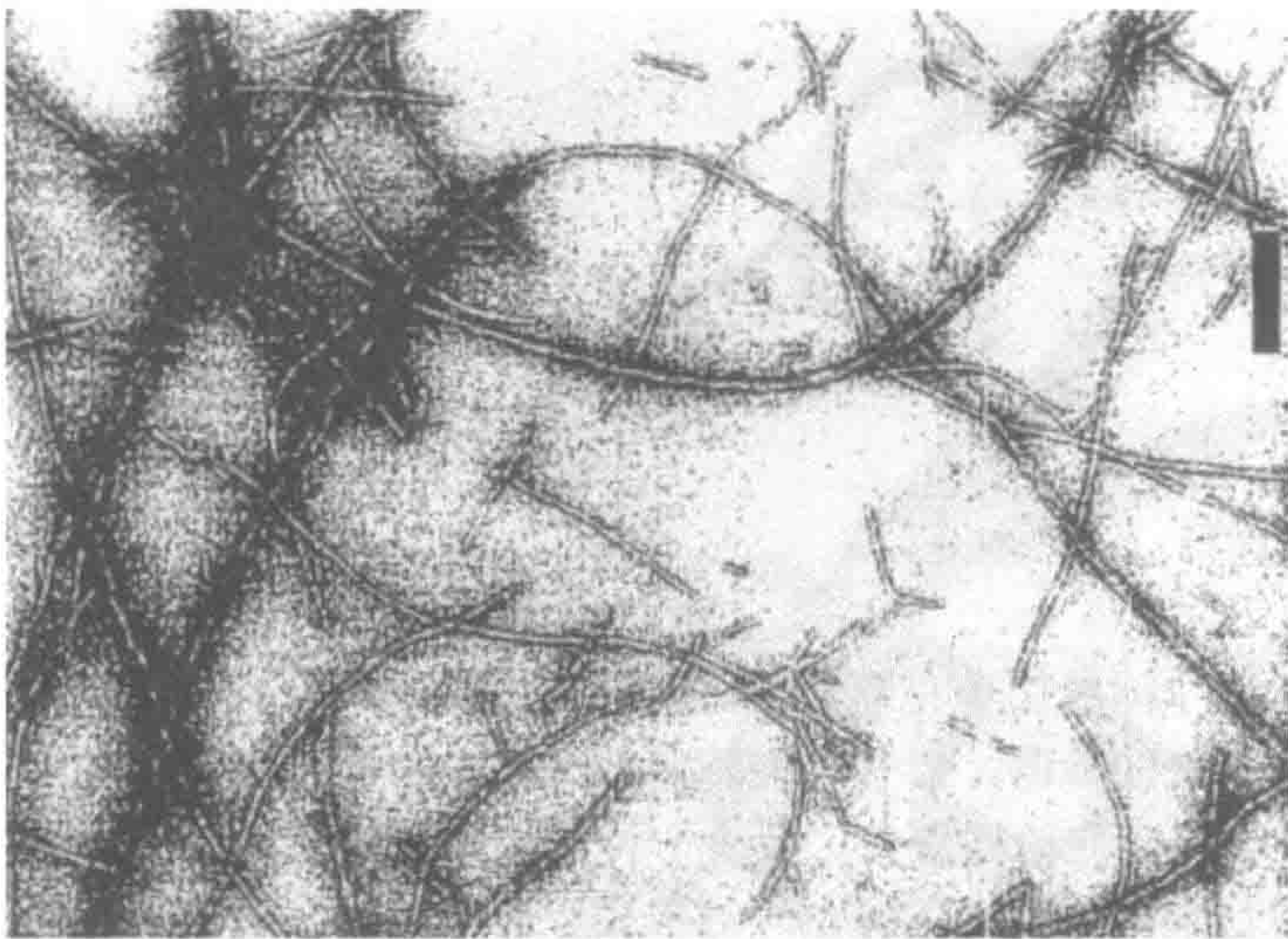


图 19.6　电子纤维图显示溶菌酶形成的淀粉样纤维[10]

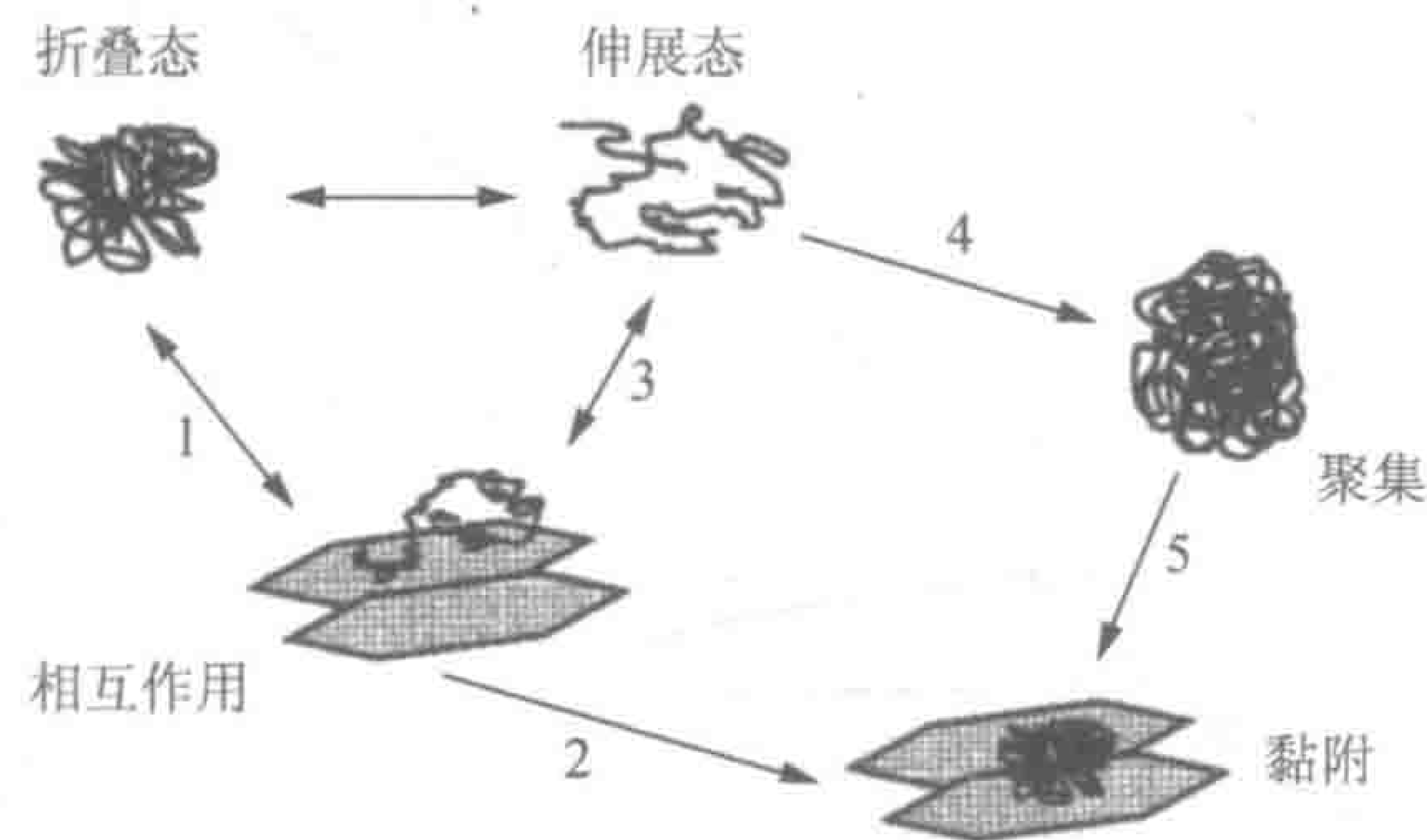


图 19.7　由于β(25-35)淀粉样与折叠状态相互作用纤维形成的机制[16]

19.3.5　朊病毒

朊病毒可能代表类蛋白质和缺乏核酸的传染性病原体独特类型。朊病毒是一个宿主-编码的蛋白质异常形式，该蛋白质能与正常对应物相互作用并导致它变成异常蛋白质。朊病毒一词包含广泛定义，从关注传染性海绵样脑病（TSE）的类蛋白质感染剂，到包括传染性蛋白质或基于蛋白质的遗传元件[18]。朊病毒假说断言，有聚集体、淀粉样变蛋白酶抗性形式（蛋白酶敏感朊病毒蛋白 PrP-res 或 PrP^{Sc} 细胞海绵状变性朊病毒蛋白）的 PrP（朊病毒蛋白单体，译者注）的异常形式，就可能是诱导正常的蛋白酶敏感 PrP（PrP-sen 或 PrP^{C}）变化聚集体的传染源。抗蛋白酶朊病毒蛋白（PrP-res）通常与 TSE 感染性有关，

在无细胞反应中能诱导 PrP-sen 转化为聚集态抗性蛋白酶[18]。在这种情况下，形成的聚集体进一步诱导正常蛋白质的聚集。因此，朊病毒被称为传染性朊病毒，不同于其他形式的淀粉样蛋白。然而，从电子显微图和 X 射线纤维衍射观察到，朊病毒基因集合体具有纤维状结构[11,18]。用刚果红染料可以染色这些聚集体，表明朊病毒是中性淀粉样蛋白[18]。

“晶种”（seeding）机制也被称为有核聚合，已提议作为朊病毒聚集的模式。研究这些机制是非常重要的，因为这种疾病是跨越物种屏障传播，从牲口（牛、羊）到人类，故命名为动物传染性海绵样脑病（TSE）。朊病毒 PrP^{Sc} 能适应类似于淀粉样蛋白纤维状结构。设计了一种可能的治疗方法，阻止朊病毒中间体组装成朊病毒粒子的模拟肽学[19]。淀粉样朊病毒形成的两个模型如图 19.8 和图 19.9 所示。

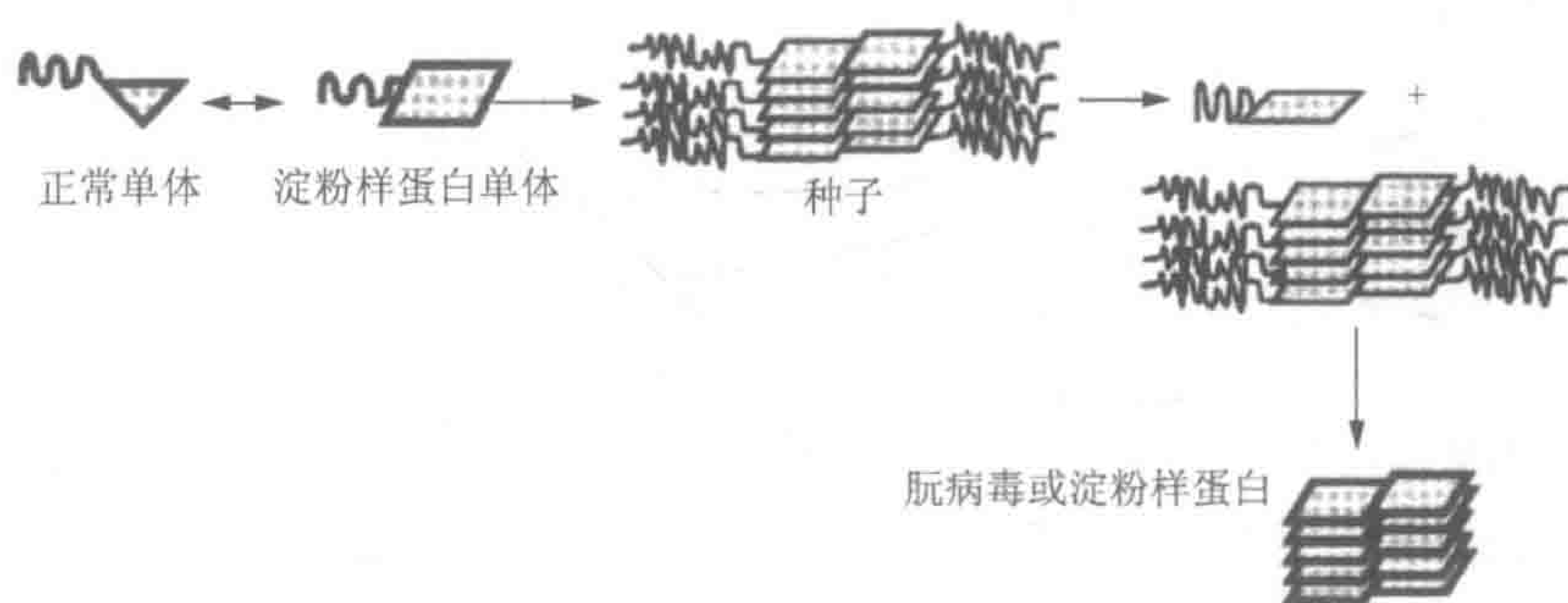


图 19.8　淀粉样朊病毒形成的非催化模式

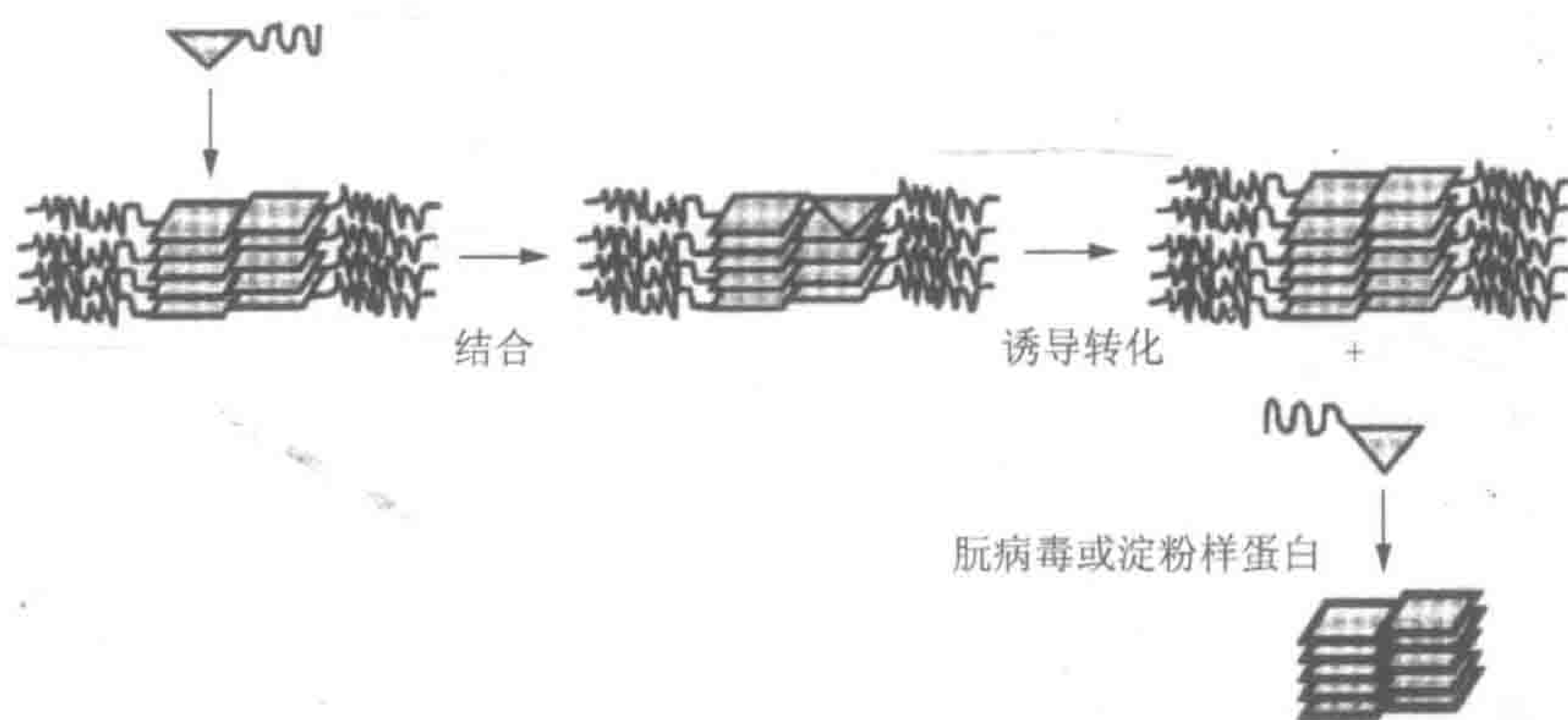


图 19.9　淀粉样朊病毒形成的自身催化模式

19.4　共同的纤维特性

来自不同的前体蛋白组成的淀粉样纤维蛋白的原纤维衍射数据几乎是一样的。这表明，尽管在 17 前体蛋白[7]之间缺乏一级或三级结构同源性，淀粉样蛋白的结构是共同的。一系列的实验尤其是纤维 X 射线衍射表明该纤维具有丰富的β-折叠特征。这些折叠转角

垂直于原纤维轴产生所描述的交叉β结构。这一观察数据，显然鉴于这样的事实，即与这些疾病有关的蛋白质可溶的天然形式，其性质发生了相当大的变化。蛋白质的纤维状形式的这种相似性提示，在淀粉样蛋白纤维的内在结构中和它们形成的机制有强烈的相似性[10]。

此外，有证据表明，这一由不同蛋白质组成的不同淀粉样纤维，具有相同的分子形式。所有淀粉样蛋白纤维似乎表现出以下分子特性是现在被推崇的淀粉样蛋白诊断方法[11]：

1）电子显微镜外观。淀粉样纤维在显微镜下检查，几乎展现均匀纤维直径 100Å。该纤维是直链，无支链，并显示出光滑的表面，没有任何明显的表面瑕疵。

2）着色特性。所有淀粉样纤维可用重氮染色染料刚果红染色，并表现出苹果绿双折射，这是诊断淀粉样蛋白最广泛用途。这可能是刚果红分子结合并由淀粉样纤维的特定方式排序。然而其相互作用有待表征。

3）X 射线衍射图。淀粉样原纤维引发了相当尖锐和 4.7Å 子午线控制的 X 射线纤维衍射图，有较弱的和更分散的 10Å 的赤道反射。

X 射线衍射图是指特定类型β-折叠结构，称为交联β结构。β-折叠平行于纤维轴排列，它们的β链组分垂直于纤维轴。这些相同的特性似乎发生在来自不同淀粉样疾病和来自不同前体蛋白的淀粉样原纤维。每个淀粉样蛋白聚集体是原纤维，即由亚基被称为亚原丝的几个原丝组成，从一种免疫球蛋白（Ig）轻链形成离体纤维，发现直径是 75～80Å，并且由 5 个或 6 个原丝组成，每个原丝为 25～30Å 宽，彼此平行排列。原丝呈现 2 个或 3 个 10～15Å 宽亚基链所组成，被称为亚基原丝。它们以 30～50Å 重复螺旋排列[11]。表 19.1 列出不同的淀粉样纤维与它们的维度亚结构。

表 19.1　淀粉样纤维结构与纬度[9]

淀粉样蛋白	纤维维度	底物
血清淀粉样蛋白 A 或 Ig 轻链	75～80Å 维度	五边形阵列的 5 个 25～35Å 原丝
TTR（FAP）	130Å 维度	直角截面阵列的 4 个 50～60Å 原丝
Aβ 肽	90Å 维度	五边形或六边形阵列的 5～6 个 20～30Å 原丝
降血钙素	50～60Å 维度	—
朊病毒	60～200Å 丝带	原丝平面组装

从不同的多肽前体衍生的淀粉样原纤维，可能由不同数量和原丝排列所组成。在淀粉样纤维横切面维度中变种可以联合产生易变性。然而，易变性的程度可提供淀粉样蛋白原纤维的共同分子结构信息。

所有淀粉样原纤维都含有β-折叠结构，在β-折叠结构中肽链与纤维生长的方向垂直[15]。TTR 淀粉样蛋白纤维连续β-折叠螺旋的核心结构，可以扩大到由蛋白质与溶菌酶和免疫球蛋白轻链多样性一样的蛋白质，形成其他淀粉样蛋白[18]。原纤维是一种与疾病相关的附带现象[15]。形成淀粉样原纤维的能力并不是全部或部分与蛋白质那些特征相

关，而是与淀粉样变性相关。这是适当的条件下许多或实际上所有蛋白质的共同属性[10]。因此，在现实中，来自不同肽和蛋白质的原纤维，变种是一个共同主题。

它们中间原丝的尺度和β链的长度可以通过对展开的多肽链生理化学性质进行测定[10]。换言之，以形成淀粉样蛋白潜力可以基于蛋白质的生理化学性质进行预测[20,21]。原纤维多肽的性质用于定义淀粉样变性的类型，它会影响疾病状态的病理学。尽管如此，所有的淀粉样蛋白原纤维，无论前体的性质还是在体内沉淀的部位，似乎有一个相关的超微结构和密切相似的分子核结构[11]。

19.5　淀粉样纤维的 X 射线衍射研究

将纤维状蛋白质样品，如淀粉样蛋白，通常暴露于 X 射线束，纤维长轴或多或少垂直于光束方向。X 射线反射，然后通过方向区分，参照纤维轴和图案中心的距离：子午线反射定义为位于平行于纤维轴那些结构，赤道反射是纤维轴右端角那些位点。

血清淀粉样蛋白 A 和轻链淀粉样蛋白纤维衍射研究的最早报道表明，强烈子午反射为 4.68Å 和赤道反射为 9.8Å。这就是交联β结构的特性，只有淀粉样蛋白原纤维是由两个或更多β-折叠组成的原丝，才会出现这种特征。从与阿尔茨海默病相关的老年斑分离的淀粉样纤维核，显示 4.76Å 和大约 10.6Å 的反射。朊病毒棒展现出突起的 4.72Å 横向间距和一个 8.26Å 赤道间距。

迄今为止，研究最彻底的淀粉样纤维，已从那些瑞典家族性淀粉样多发性神经病患者中提取。用 X 射线衍射，研究了各种淀粉样蛋白原纤维，包括来自患者离体原纤维与 Ig 轻链、血清淀粉样蛋白 A 的分子结构、载脂蛋白 A-1、TTR 两个不同的变体、溶菌酶淀粉样变性和从 TTR 淀粉样蛋白变性片段合成的淀粉样蛋白纤维。胰岛相关多肽和高清晰度图像如图 19.10 所示。从图 19.10 可以看出，尽管在尺度和原纤维的多肽前体的结构和大小有很大差异，但衍射图案相似性非常明显。这表明不同的淀粉样蛋白原纤维实际上共享纤维轴上的分子骨架，具有相同的原子间距[11]。

经 X 射线图子午线中角度和高角度区域衍射的相似性，只有在纤维具有良好定义和密切相似的分子结构才会出现，至少就有序核心成分而言是这样的。因此，即使不是全部，显然大多数淀粉样蛋白原纤维，像详细描述的 TTR 淀粉样原纤维连续β-折叠-螺旋一样有核心结构。含有β-折叠-转角-螺旋的淀粉样原丝模型，提出了根据目前研究的所有淀粉样原纤维衍射图展示的主要特征一致的合理解释。在此框架内，由不同数量或不同排列的原丝组成的原纤维存在很多可能性。此外，由于需要不同大小环连接β链的合并，原丝可能改变它的直径。

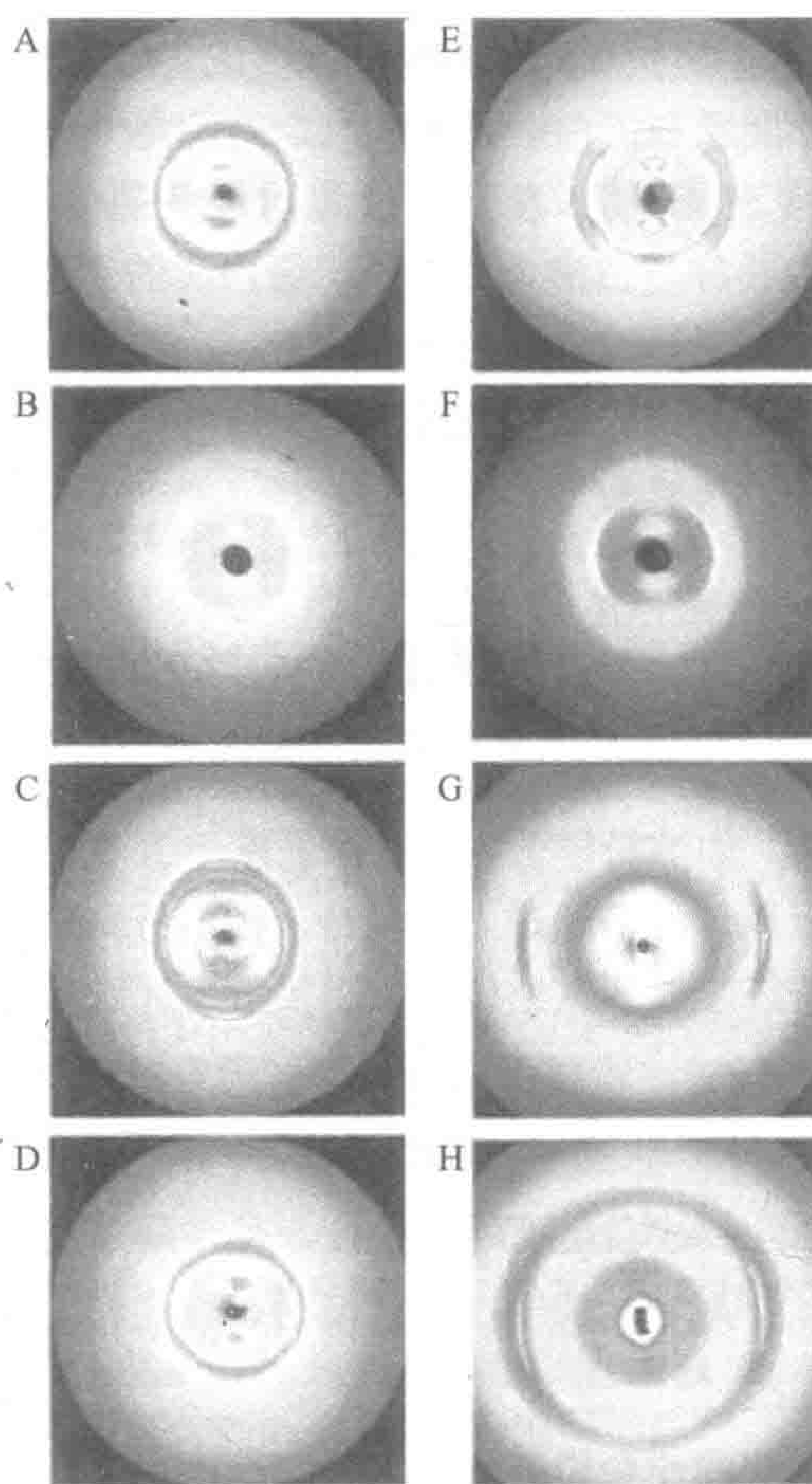


图 19.10 X 射线纤维衍射显示来自具有相同核心结构不同蛋白质的 8 种不同的淀粉样原纤维：（A、B、E）TTR；（C）载脂蛋白；（D）免疫球蛋白；（F）胰岛相关肽；（G）血清淀粉样蛋白 A；（H）溶菌酶[11]（彩图请扫封底二维码）

另外，一些淀粉样蛋白也可能由只有一对β-折叠组成，而不是两对β-折叠构成 TTR 淀粉样原丝。尽管有相当大差异的可能性，但衍射模式证明的共同核心结构表明，淀粉样蛋白原纤维确实有良好定义的，占有特征疾病形成性能比重的通用分子结构[11]。由淀粉样纤维密切相似的交联β纤维衍射模式展示表明，这种潜在的有序结构主要是β-折叠。此外，β链与纤维轴成直角排列[11]。

19.6 淀粉样蛋白形成的联合机制

所有蛋白质构象的性质，应从对这种结构多重稳定态的角度来考虑[10]。图 19.11 联合机制提出，生物合成后各种结构等待多肽链，其中包括淀粉样蛋白纤维的形成机制[10,22]。此外，如果蛋白质能够快速折叠，任何部分折叠物将会短命，并将减小分子间的相互作用发生的概率。而且，一旦折叠，天然状态通常是多肽主链隐藏在它内部的高

度紧凑结构。这种状态防止聚集除非通过表面侧链的相互作用而聚集（如蛋白质结晶的情形）。这种状态是不会形成强的分子间氢键与多肽骨架结合。如果在合适折叠的条件下维持天然状态，接下来淀粉样纤维的聚集将被非折叠结合的动态屏障所抵制，即使是热力学上更稳定的聚集状态也一样[10]。

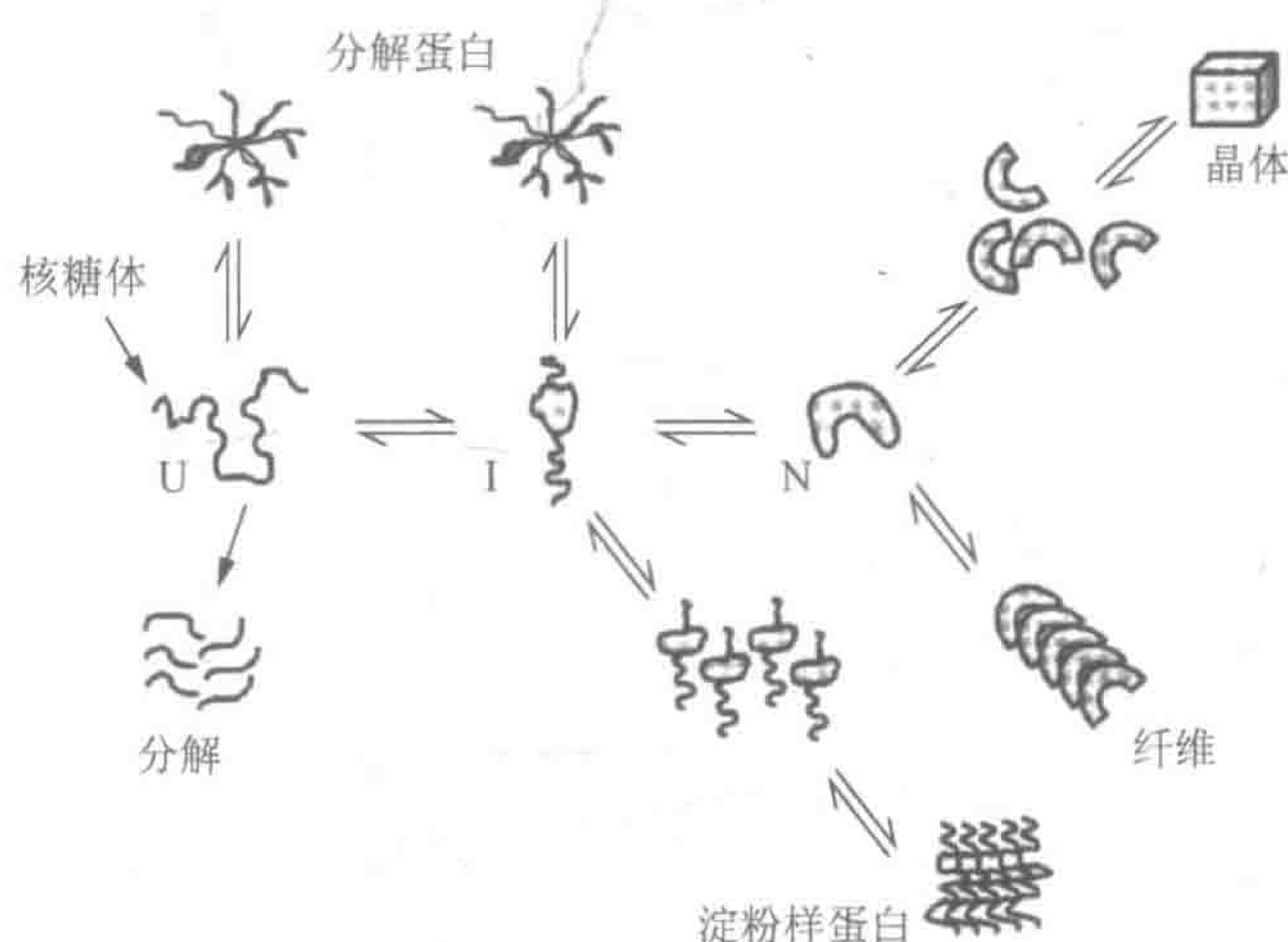


图 19.11 淀粉样蛋白纤维形成的联合机制[10,22]

α-突触核蛋白编码基因突变引起的帕金森病，是以细胞质的神经元沉淀为特征。这些沉淀在大脑影响区的路易氏小体，类似于淀粉样纤维。这已经由原子力显微镜和电子显微镜、独特染料结合属性（刚果红和硫磺素 T）和反平行β-折叠结构（傅里叶变换红外光谱和圆二色光谱）的形貌研究所确定[23]。

19.7 治 疗 策 略

淀粉样结构的通用图片和形成机制，结合与这种物质沉积相关的不同病理条件提供了概念框架。这就提示，这可能是淀粉样蛋白疾病的整个家族预防或治疗的常规方案[10]。人工伴侣（洗涤剂和环糊精）系统已成功地应用于减少变性诱导溶菌酶复性中的聚集。渗透因子和其他稳定化配体可能减少聚集量。这可能反映了原生状态不同的稳定性。已被证明渗透因子可抑制羊瘙痒病系统中朊病毒的形成，这与朊病毒形成中蛋白质构象变化的掺入相一致[3]。

增加淀粉样蛋白形成速率是朊病毒蛋白传播的一种方式。因此，通过引入可能结合和稳定原生状态的配体而减少传播，将会减少聚集体的形成。治疗家族性淀粉样多发性神经病（FAP）外科基因疗法，是将野生型 TTR 替换 FAP 突变体，原理是：①停止纤维形成；②清除已存在的淀粉样蛋白；③临床上改善不会出现转移的并发症[7]。通过蛋白质序列修饰来完成这项工作[10]。减少聚集导致临床症状的消除或减少。

例如，使用小蛋白如酸性磷酸酶，已经证明这可能是原生态蛋白质在稳定性较差的条件下，减少淀粉样纤维蛋白形成趋势的一般方法[10]。除了这些治疗策略，其他技术的

设计旨在通过阻止纤维增长，或稳定α-螺旋或随机盘绕结构，从而抑制淀粉样蛋白的形成。这可以防止β肽沉淀到淀粉样蛋白结构和变成神经细胞毒素[24]。像基因工程的新型治疗策略一样，消除淀粉样纤维形成，有希望全盘消除由蛋白质错误折叠引起的致命疾病[25]。这也许会有助于纤维具有同样的核芯结构和具有共同的特性。

参考文献

[1] Kelly, J. W. (1996) Alternative conformations of amyloidogenic proteins govertheir behavior. *Curr. Biol.* 6, 11–17.

[2] Yutani, K., Takayama, G., Goda, S., et al. (2000) The process of amyloid-like fibril formation by methionine aminopeptidase from a hyperthermophile, Pyrococcus furiosus. *Biochemistry* 39, 2769–2777.

[3] Fink, A. L. (1998) Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding Design* 3, R9–R23.

[4] Minton, A. P. (2000) Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 34–39.

[5] Minton, A. P. (2000) Protein folding: thickening the broth. *Curr. Biol.* 10, R97– R99.

[6] Belloti, V., Mangione, P., and Stoppini, M. (1999) Biological activity and pathological implications of misfolded proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 977–991.

[7] Kelly, J. W. (1998) The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 101–106.

[8] Demchenko, A. P. (1999) Protein folding with molecular chaperones: stochastic process under control. *Biophysics* 45, 404–410.

[9] Oza, V. B., Smith, C., Raman, P., et al. (2002) *J. Med. Chem.* 45, 321–332.

[10] Dobson, C. M. (2001) The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B Biol. Sci.* 356, 133–145.

[11] Serpell, L. C., Sunde, M., and Blake, C. C. F. (1997) The molecular basis of amyloidosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 53, 871–887.

[12] Kiefhaber, T. (1995) Kinetic traps in lysozyme folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9029–9033.

[13] Takano, K., Funahashi, J., and Yutani, K. (2001) The stability and folding process of amyloidogenic mutant human lysozymes. *Eur. J. Biochem.* 268, 155–159.

[14] Canet, D., Sunde, M., Last, A. M., Miranker, A., Spencer, A., Robinson, C. V., and Dobson, C. M. (1999) Mechanistic studies of the folding of human lysozyme and the origin of amyloidogenic behavior in its disease-related variants. *Biochemistry* 38, 6419–6427.

[15] Lansbury, P. T., Jr. (1999) Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3342– 3344.

[16] Konno, T. (2001) Amyloid-induced aggregation and precipitation of soluble proteins: an electrostatic contribution of the Alzheimer's β(25-35) amyloid fibril. *Biochemistry* 40, 2148–2154.

[17] Wagner, M. R., Keane, D. M., Melchor, J. P., Auspaker, K. R., and VanNostrand, W. E. (2000) Fibrillar amyloid β-protein binds protease nexin-2/amyloid β-protein precursor: stimulation of its inhibition of coagulation factor XIa. *Biochemistry* 39, 7420–7427.

[18] Caughey, B. (2000) Transmissible spongiform encephalopathies, amyloidoses and yeast prions: common threads? *Nat. Med.* 6, 751–754.

[19] Kelly, J. W. (1998) The environmental dependency of protein folding best explains prion and Amyloid diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 930–932.

[20] Gujjaro, J. I., Sunde, M., Jones, J. A., Campbell, I. D., and Dobson, C. M. (1998) Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4224–4228.

[21] Kallijärvi, J., Haltia, M., and Baumann, M. (2001) Amphoterin includes a sequence motif which is homologous to the Alzheimer's β-amyloid peptide (Aβ), forms Amyloid fibrils in vitro, and binds avidly to Aβ. *Biochemistry* 40, 10,032– 10,037.

[22] Dobson, C. M. and Karplus, M. (1999) The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 92–101.

[23] Conway, K. A., Harper, J. D., and Lansbury, P. T., Jr. (2000) Fibrils formed in vitro from α-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical Amyloid. *Biochemistry* 39, 2552–2563.

[24] Ma, K., Clancy, E. L., Zhang, Y., Ray, D. G., Wollenberg, K., and Zagorski, M. G. (1999) Residue-specific pK_a measurements of the β-peptide and mechanism of pH-induced Amyloid formation. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 8698–8706.

[25] Lee, S. C., Lee, M. J., Choi, I., and Yu, M. H. (1997) Genetically engineered human interleukin-6 variant with enhanced stability. *Biotechnol. Lett.* 19, 885–888.

第 20 章　纳米分辨率生物测定的近场扫描光学显微镜

Musundi B. Wabuyele, Mustafa Culha,
Guy D. Griffin, Pierre M. Viallet, Tuan Vo-Dinh

概　　述

像表面上的吸附或沉淀一样，人们对原位和位点纳米结构域中生物分子的无损图像实验产生了相当大的兴趣。近场扫描光学显微镜（NSOM）是一种拥有小于 100nm 范围的惊人分辨力的新兴技术，相比其他扫描探针显微镜是实现这一无损性质目标的新兴技术。以单分子水平的分辨率，近场扫描光学显微镜可能是用于表面蛋白可视化的重要工具，以获取更多定向和定位信息而不会干扰他们的原始定向和位置，以及与表面的相互作用水平。科学和医学的几个领域受益于这种研究类型，尤其是对生物医学和生物芯片的应用。为了说明可能的应用，将用近场扫描光学显微镜证明，在肿瘤细胞中与多重抗性蛋白相关的绿色荧光蛋白和生物分子成像。

关键词：近场扫描光学显微镜；蛋白质；生物分子；多药耐药转运蛋白；P-糖蛋白

20.1　导　　论

光学显微镜是一种重要的技术，它广泛应用于科学和技术领域，从活体样品成像和先进材料表征到半导体光谱分析。还有一项越来越多的要求，那就是更高的空间分辨率，以获得更多有关样品所在区域或表面分子或细胞内分子的信息。令人失望的是，传统的光学的分辨率极限，如用阿贝[1]，$\lambda/2$ 或 200 nm 的可见光来测定。1928 年，Synge [2]受到光激发孔径粗略定义有亚波长尺度孔径的维度的启发，克服了这样的障碍。尽管这一原理是 1972 年首次证明光谱的微波波段[3]，它仍可以应用设计光学波长和引进亚波长孔径光学探针。近场扫描光学显微镜（NSOM）不仅克服了来自传统的光学衍射极限，而且还结合加强横向和纵向分辨率，使用典型的扫描探针显微镜同时测量样品的形貌和光学信号。

扫描探针显微镜（SPM）被高分辨率扫描力显微镜（AFM）和扫描隧道显微镜（STM）等技术的发展彻底改变了。使用原子力显微镜在分子水平上已成功证明生物样品，如细胞或 DNA 高分辨率成像。然而，只可获得形貌信息，因为原子力显微镜获取图像是基于探针针尖与样品的表面之间的相互作用力。另外，扫描隧道显微镜样品必须是导电的。与此相反，近场扫描光学显微镜的探头不接触样品，因此，它对样品是无创性和不扰动（图 20.1）[4]。NSOM 结合了增强的横向和纵向分辨率，达到接近纳米尺度的空间分辨率。

这是超越其他扫描和光学技术的明显优势，可以帮助研究人员理解，受到几个科学领域包括纳米技术、生物材料科学和生物科学的挑战的现象。

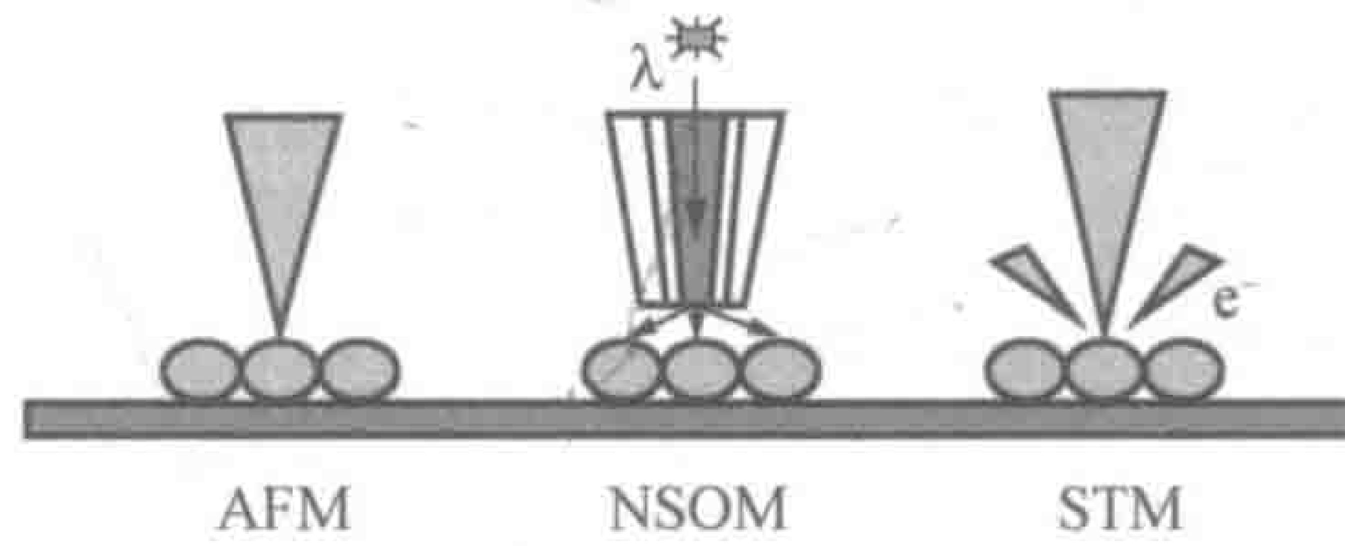


图 20.1　扫描探针显微镜的比较。原子力显微镜涉及悬臂扫描样品的表面。测量的悬臂挠度用于生成拓扑图像。NSOM 涉及激光耦合锥形光纤传感探头和用于激发荧光探针扫描样品的表面。STM 拥有偏置电压尖锐的导电针尖应用于针尖与样品之间。当针尖通过样品内 10Å 时，样品中的电子（e^-）开始通过“隧道”空隙进入尖端。由此产生的隧道电流随针尖-样品间距和它的信号用于创建 STM 图像

NSOM 基于非常小的光源扫描与其尺度小于非常接近（近场）样品的波长。光源是末端和外壁上涂有铝的锥形的透镜光纤。耦合到光纤的光是来自于锥形和铝包膜的一端的辐射。这些发散光穿过（50～100nm）孔径，从探针针尖将指数衰减掉。如图 20.2 所示，在小于入射光的波长（λ）距离 h_1 的样品近场强度给出了高分辨率的图像，相比那些从远场照明所得那些激发光，其中距离 $h_2>>\lambda$ 和更大的孔径。因此，图像的亚波长详细信息将丢失。

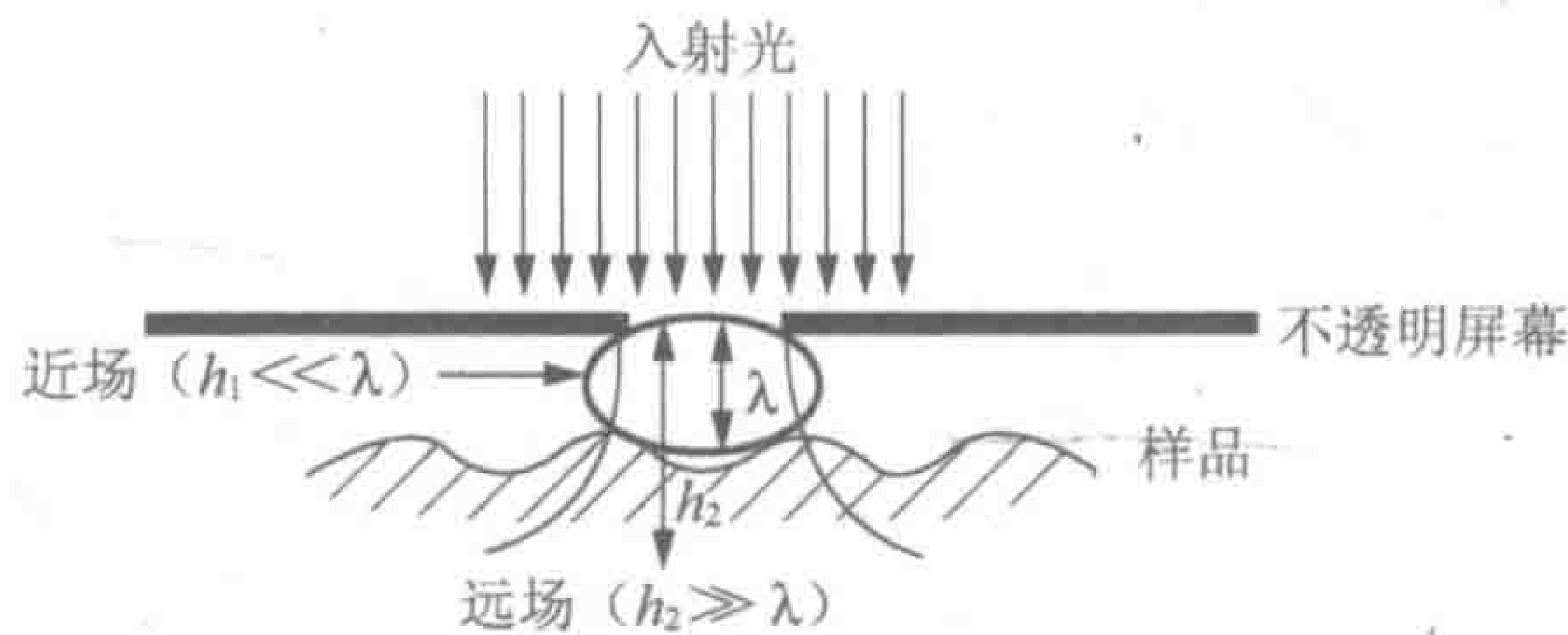


图 20.2　NSOM 原理。亚波长大小孔径定义激光和照亮样品非常接近（通常＜10nm）（近场）h_1 和 h_2（远场）深度

在过去 10 年里，NSOM 已经演变为一个具有高度影响和巨大潜力的新的科学前沿[5]，范围从生物医药到生物科学分析的各个研究领域。Betzig 和 Chichesterd 等第一批先行者，用 NSOM 研究了生物组织[6]。用 NSOM 研究了猴子大脑海马区薄切片的影像。企图区分细胞骨架中单一肌动蛋白微丝的其他的实验也已完成。用罗丹明标记鬼笔环肽，对肌动蛋白微丝选择性染色和采用 NSOM 成像[7,8]。Moers 等[9]结合细胞化学和扫描探针技术，研究了荧光标记的染色体，用非同寻常的分辨率，对单个染色体上几种荧光标记的基因组 DNA 片段进行定位和鉴定。1998 年，Garcia-Parajo 等[10]研究了单个荧光分子光动力学，精确定位为 1nm。之后，Garcia-Parajo 等[11]报道了绿色荧光蛋白（GFP）作为个体的标记，应用于分子生物学，详细了解光物理和光动力学的研究。他们研究了玻璃表面上和嵌入到水凝胶孔隙中，GFP 的 S65T 单个突变体。Kirsch 等[12]研究了以氯化十六烷基吡啶复包被的云母上，pUC18 伸展环形质粒 DNA 的成像。此研究证明了与来自于生物大分子荧光光学信号偶联中，剪切力信号（形貌）的适用性。

几个小组已经证明，NSOM 在细胞生物学研究中的应用。这些应用包括由 Betzig 等对 3T3 成纤维细胞的细胞骨架成分成像[13]，以及疟疾和感染了人类疟疾寄生虫镰状疟原虫（*Plasmodium falciperum*）的红细胞中的、宿主骨骼肌蛋白膜的成像和定位[14]。其他研究包括用 NSOM 检测 erB2 受体依赖激活聚类、在乳腺癌患者中过表达的表皮生长因子（EGF）家族的成员[15]。在另一项研究中，Deckert 等[16]结合 NSOM 和表面增强拉曼散射（SERS）对在蒸发干燥的银层包被的、聚四氟乙烯树脂微球上的甲酚亮蓝标记的 DNA 成像。用空间高分辨力单分子荧光敏感度对荧光标记的 DNA 成像表明，在报道的试验条件下，并没有观察到样品变形[17]。在另一项研究中，研究者用平面银基于岛的表面增强拉曼散射衬底，产生表面增强拉曼散射信号和化学蚀刻、200nm 光纤尖头传输氩离子激光器提供的激发辐射（488nm)。为了定义对 200nm 探头尖激发辐射，将光纤探头针尖的圆锥面涂上厚厚的不透明金属层，从而允许局部样品的激发。与衬底到纤维针尖结合间距约 0.1nm，用亚波长的横向分辨率这一因素，有助于获得分布在银岛基衬底上的 CFV 与罗丹明 6G 分子光谱和空间信息[18,19]。此外，表面增强拉曼散射探针-近场扫描光学显微镜技术表现出优越的敏感性。已经记录了少于 300 个分子的光谱。Schmalenberg 等[20]用原子力显微镜和近场扫描光学显微镜，研究了干燥和水合环境中玻璃表面上的粘连蛋白和牛血清白蛋白成像。

用生物分子如蛋白质产生模式表面的能力，对于生物传感器技术[21]、组织工程[22]、表面蛋白质吸附的基础研究，以及生物相容性材料的发展是非常重要的。随着基因组学和蛋白质组学的广泛研究，发展了生物芯片的概念。生物芯片是点的阵列，每个点含有少量的蛋白质和 DNA 片段。在蛋白质芯片中，点含有一系列蛋白质，采用纳米分辨率的近场扫描光学显微镜在原位和方向上实施这些蛋白质可视化，对于了解它们与其他分子的相互作用方面可能发挥关键作用。

在目前研究中，我们调查了多重耐药性（MDR）转运蛋白的定位和它们对化疗药物的效果。由于多重耐药性蛋白在细胞中的表达，多重耐药性已成为化疗药物成功递送的主要障碍。通过这个机制，癌症细胞变成对不同结构的许多药物，以及接触这些药物的途径产生抗性。两种蛋白质[多重耐药蛋白（MRP）和 P 糖蛋白（P-gp）]在多重耐药性现象中起着关键的作用；然而，他们的位置和作用机制仍然是感兴趣的主题。除了共聚焦显微镜和以前报道的其他生物技术，我们应用近场光学显微镜的优势，测定了人癌症的化疗治疗中这些蛋白质的定位和影响。

20.2 材　料

20.2.1 细胞系

中国仓鼠卵巢（CHO）系得自美国典型培养保藏中心（马纳萨斯，弗吉尼亚州，美国）。MTLN3 细胞由 Jeffrey E. Segall 博士（阿尔伯特·爱因斯坦医学院，解剖学和结构生物学系）提供。

20.2.1.1 细胞培养和固定

细胞（95%湿度，5% CO_2，37℃）在细胞培养玻片（Nalge Nunc 公司，内珀维尔，伊利诺伊州，美国）上培养。在 F-12（Invitrogen 公司，卡尔斯巴德，加利福尼亚州，美

国）和 10%胎牛血清（FBS）（Gibco 公司，格兰德岛，纽约州，美国）中培养 CHO 细胞；以及在含 5% FBS 的 Dulbecco 改良 Eagle 氏培养基（Invitrogen 公司）与 0.5% Pen/Strep 中培养 MTLN3 细胞。当细胞达到 70%～80%汇集（3 天）时，CHO 和 MTLN3 以 1∶20 的分流比，将它们传代培养。用 4%多聚甲醛固定细胞 5min，随后用甲醇多次漂洗，随后用 100%冷乙醇漂洗。

20.2.1.2　用药物和染料标记细胞

黄绿色荧光 FluoSpheres 珠和 BODIPY® FL 盐酸维拉帕米购自 Molecular Probes 公司。阿霉素（DOX）获得自 Sigma 公司（圣路易斯，密苏里州，美国）。细胞与指定的染料和药物在各自培养基，在 5% CO_2，37℃培养箱中培养 2h。固定前，将细胞用磷酸液生理盐水洗涤。

20.2.2　近场光学显微镜仪器

1）仪器平台（底板安装在硬件上）。
2）极光-2 传感器头。
3）电子控制设备（ECU-*Plus*）与 I/O 10 和 I/O MOD+板。
4）Aurora 控制单元。
5）计算机。
6）视频监控。
7）NSOM 光纤探针头。
8）探测器安装工具。
9）光纤切割刀。
10）纤维剥线工具。
11）工具盒。
12）NSOM 标准样品。
13）用户手册。
14）SPMLab 软件。
15）SPMLab 软件参考手册。
16）激光。
17）激光耦合器。
18）振动隔离表。

20.2.2.1　系统设置

我们实验室用 TopoMetrix Aurora-2 近场扫描光学显微镜。Aurora-2 仪器是获得形貌和光学图像的平台。样品安装在 X-Y 坐标扫描台上，由安排三个压电扫描器控制。光纤探针是安装在可移动的 Aurora-2 显微镜头上，位于样品上方。形貌和光学图像可以同时进行。如图 20.3 所示，光纤针尖下面保持 5～10nm 距离，样品横向扫描，监测横向振动尖头和样品表面的剪切力相互作用。扫描过程由扫描探针显微镜系统的电子控制。Aurora-2 系统光学元件用于获得 NSOM 数据，以及光学聚焦和监测探针-样品的方法。旋转镜（图 20.4）选择反射或传动物镜。两个“鱼鳍”镜可以手动翻转，允许使用光电倍增管（PMT）或可选的硬件，如光子计数器或分光光度计。

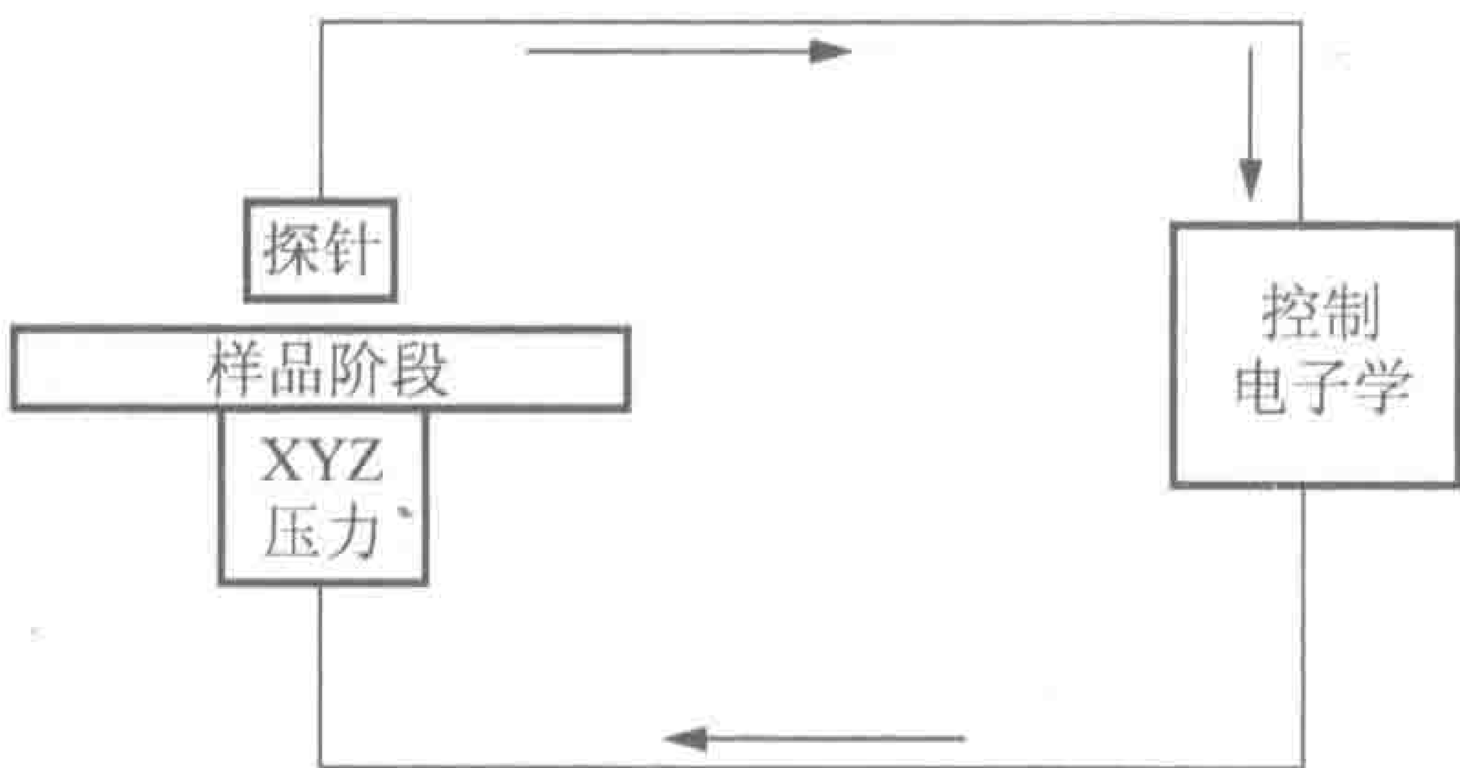


图 20.3　显示外形反馈回路的 Aurora-2 系统示意图布局。样品安装在扫描区域内，它安排由 3 个压电扫描珥控制。光纤探针安装在可移动的 Aurora-2 显微镜头上，位于样本上方

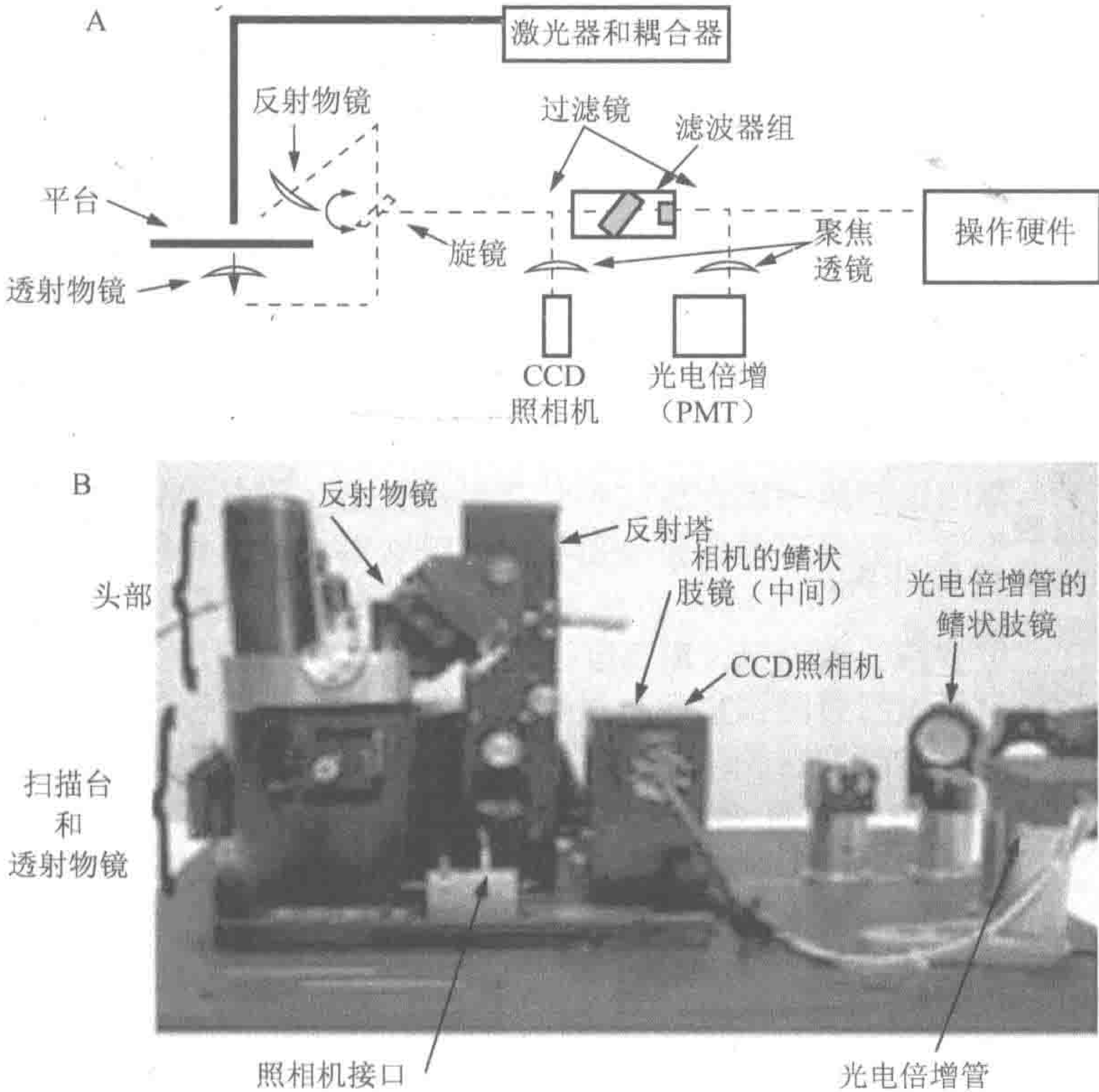


图 20.4　方块图显示光路（A）和 Aurora-2 系统（B）的组成框图。CCD。电荷耦合器件

根据研究发色团的种类，使用多重激发源进行 NSOM 的成像。我们的实验，使用配备激光线型滤波器的 488nm 氩离子激光作为激发光源。通过×40，0.65N 传输方式收集发射光。目镜和一组过滤器、二色镜（510DF10）和带通滤波器（520LP10）购自 Omega Optical 公司。然后用光电倍增管检测荧光信号并用商业软件（SPMLab）进行分析。

20.3　方　法

接下来讨论和介绍样品、探头安装、激光耦合，以及提供样品制备举例和细胞中生

物分子形貌和 NSOM 同时成像的实验方案。

20.3.1　样品制备

在光学透明薄玻璃衬底上制备样品。培养细胞并将其固定在 200mm 厚的玻璃池内。为了获得好的成像效果，样品必须相对平坦。通常情况下，样品的高度特征为小于 500nm 大小和 30μm×30μm 的扫描范围是可以接受的。粗糙表面使反馈产生困难，因为针头容易损坏（见 20.4 节注意事项 1）。

20.3.2　样品和探头安装及激光耦合

为了装载样品，必须拆除头部，并将样品玻片简单地固定到检测台上（见 20.4 节注意事项 2～4）。在探针装载工具的帮助下将探针装入探针盒内（见 20.4 节注意事项 5）。用纤维剥离工具帮助，从纤维远端剥离掉约 2.5cm 的聚合物缓冲物后，用光纤剪刀将光纤末端剪开（见 20.4 节注意事项 6）。最后，光纤尖头插入凸轮连接器（图 20.3）。透射和反射物镜也要聚焦（见 20.4 节注意事项 7）。传动物镜用移动旋钮手动调整 X、Y 和 Z（焦点）。反射物镜通过手动旋转透镜调节聚焦。

20.3.3　样品成像

NSOM 图像是由形貌和光学信息所组成。首先获得形貌图像，这有助于设置扫描参数，确定表面特征（见 20.4 节注意事项 8）。最后，结合形貌图像完成光学扫描（见 20.4 节注意事项 9 和 10）。形貌图像与非接触模式原子力显微镜技术几乎相同。将探针引导到反馈点进行形态图扫描。一旦探头进入反馈位点，探针就可以跟踪样品的近场范围的形貌，完成 NSOM 成像。实验装置如图 20.4 所示。

20.3.4　形貌和 NSOM 图像参数

将每个探针音叉谐振频率设置最初驱动频率参数，通过调整驱动频率使音叉振动量达到最大化。通常情况下，为音叉选择 90kHz 和 100kHz 之间的频率范围。峰值上升后，需要的振幅约为 5V，对应于内传感信号约为 30nA。然后用尽可能低的驱动振幅完成微调非接触控制，同时保持内传感信号常数和均方根噪声（RMS）＜0.1。

通过两种方法将探针尖头带入反馈：“自动”和“手动”反馈。自动反馈方法使用自动特征程序编入 SPMLab 软件来降低探头与样品表面高度。手动反馈方法更难，需要更细心将探头在样品表面上降低到几微米距离。形貌成像的初始 *P-I-D* 设置为：P=1、I=0.05、D=0，设置点值是−64nA（见 20.4 节注意事项 11）。一旦探头进入表面反馈，就可以调整 *P-I-D* 参数以优化扫描（见 20.4 节注意事项 12）。

因为激光束会加热和膨胀探头，NSOM 成像获得之前必须对 *P-I-D* 设置进行一些调

整。此外，音叉频率必须重新核对。*P-I-D* 一旦优化设置后，就可以获得近场扫描光学显微镜图像（见 20.4 节注意事项 13）。

20.3.5　结果和讨论

如 Dunn[21]和 Deckert[23]先前综述的一样，近场扫描光学显微镜已成为生物学应用的有力工具。较高的分辨率激活了从染色体到膜结构域范围内分子复合物功能的研究。为了建立有效生物分子近场扫描光学显微镜成像，我们试图研究蛋白质及其在化疗药物中的作用，在细胞和细胞器亚结构内的定位，称为多药物抗性（MDR）现象，其结果来自属于 ATP 结合蛋白质盒式家族的药物转运蛋白的过度表达，已成为我们研究的焦点。

P-糖蛋白（P-gp）和多重耐药蛋白-1（MRP-1）被认为是对癌细胞的细胞毒性，天然产物两性分子药物的排出负责的两种主要蛋白质。显然，肿瘤细胞对化疗药物的抗性，一直是一个重要的临床问题，多重耐药转运蛋白功能的药理逆转，是一个非常有趣的重要领域。这些蛋白质被假定为位于等离子膜上[24,25]，然而，研究表明，它们是位于其他细胞器中的内质网上[26,27]。虽然众多因素与多重耐药的发展有关，但大量的研究支持能量依赖泵系统，在挤压或排除细胞内化疗药物中起作用[28~30]。用绿色荧光蛋白转染肿瘤细胞（MTLN3），近场扫描光学显微镜实验初步验证了我们的系统。因此这种在体内表达的蛋白质，可以作为细胞内结构和功能的指示物。先前的研究已经使表面表皮生长因子受体（EGFR），在稳定转染的中国仓鼠卵巢细胞中分布实现了可视化，中国仓鼠卵巢细胞由细胞表面生长因子受体（EGFR），与绿色荧光蛋白融合构建。图 20.5 显示 MTLN3 肿瘤细胞，表达绿色荧光蛋白融合蛋白的反馈内部信号和荧光图像。从这些近场扫描光学显微镜图像中，可以观察到蛋白质在细胞质的隔间中均匀分布。

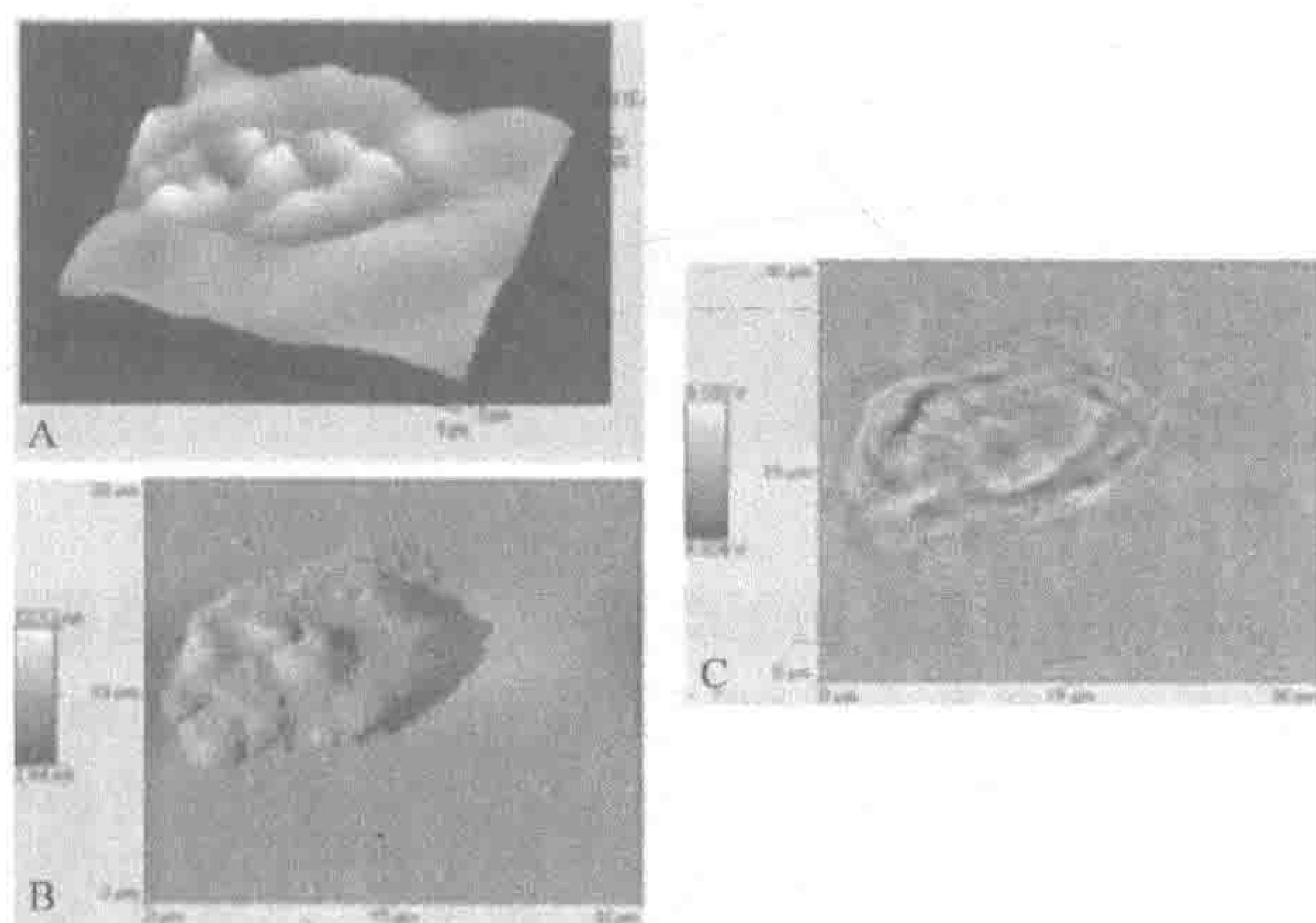


图 20.5　MTLN3 肿瘤细胞表达绿色荧光蛋白融合蛋白：（A）形貌；（B）反馈内部信号；（C）荧光（彩图请扫封底二维码）

由于近场扫描光学显微镜的优异分辨率，已经完成了每平方微米可观察到几百个分子的单分子研究。证明其灵敏度和准确度水平远优于远场方法。因此，近场扫描光学显微镜是独立观察生理上有关包装密度分子的理想技术。此外，要求高精度的前所未有信息的情况下，近场扫描光学显微镜层次细节和灵敏度，允许共定位研究。因此，我们选

择 NSOM 研究亚细胞定位及多重耐药性运输蛋白的活性。在本章中，我们没有显示蛋白质特异性位点。毫无疑问，我们确实证明了药物（药物和抑制剂）与蛋白质相互作用的定位效果。通常，MRP-1 及 P-gp 被认为是细胞表面定位，以及通过降低细胞内药物总浓度抗药性的介质[31,32]。数个研究小组，已经试图解释这样的多重耐药性现象，并使用不同的模式，如能量依赖性泵系统[30,33]的作用机制，但是这两种蛋白质的定位和作用机制仍有待进一步研究。

为了研究的 MRP-1 转运子，在蒽环类的 DOX 和黄绿色荧光 FluoSpheres（数据未显示）的定位和积聚的效果，我们使用 CHO 和 J774 细胞（数据未显示）表达了少量蛋白质。将细胞用 5μmol/L DOX 在 37℃孵育 2h。然后成像前进行漂洗和固定。如图 20.6 所示，用 DOX 温育的 CHO 细胞的形貌和荧光图像。荧光图像清楚地表明 DOX 的核定位。

从图 20.7 的结果中我们期望看到，药物在没有过度表达多重耐药性转运蛋白的细胞内高度积聚。但是，我只想说，即使还没有用这些蛋白质暴露或者传输的细胞确实表现出某种类型的抗性。我们通过抑制 P-gp 和 MRP-1，使用 MDR 换向器、维拉帕米（异搏定，一种冠状动脉扩张药，译者注）的功能来证明这种现象。有趣的是，我们观察到维拉帕米额外对 CHO 细胞，增加了四倍 DOX 的细胞毒性。这种信息清楚地表明，其他因素（蛋白质底物）也与药物抗性有关。

图 20.7 图示：仅用 5μmol/L DOX 和用 5μmol/L 的维拉帕米+5μmol/L 阿霉素，在 37℃下孵育 2h 的 CHO 细胞近场光学显微镜图像。用 MDR 转运蛋白类转染的细胞，获得了类似研究结果[27,33]。相反，用于我们研究中的细胞是正常的 CHO 细胞；因此，人们期望观察到药剂聚集过程中很少或没有影响。然而，从 CHO 细胞获得的结果表明，即使正常细胞也可以，以显著水平表达这种蛋白质，从细胞间隔中外排药物。因此，多重耐药蛋白的浓度和定位，在药物聚集过程中起重要作用。使用具有高分辨率、高灵敏度的技术如近场光学显微镜，对这些耐药蛋白的作用，提供了前所未有的细节。因此，近场光学显微镜已经证明，即使在低浓度蛋白质的情况下，也可以获得有意义的信息。对正常细胞和肿瘤细胞中特异性蛋白质定位和它们的活性的深入研究正在进行。

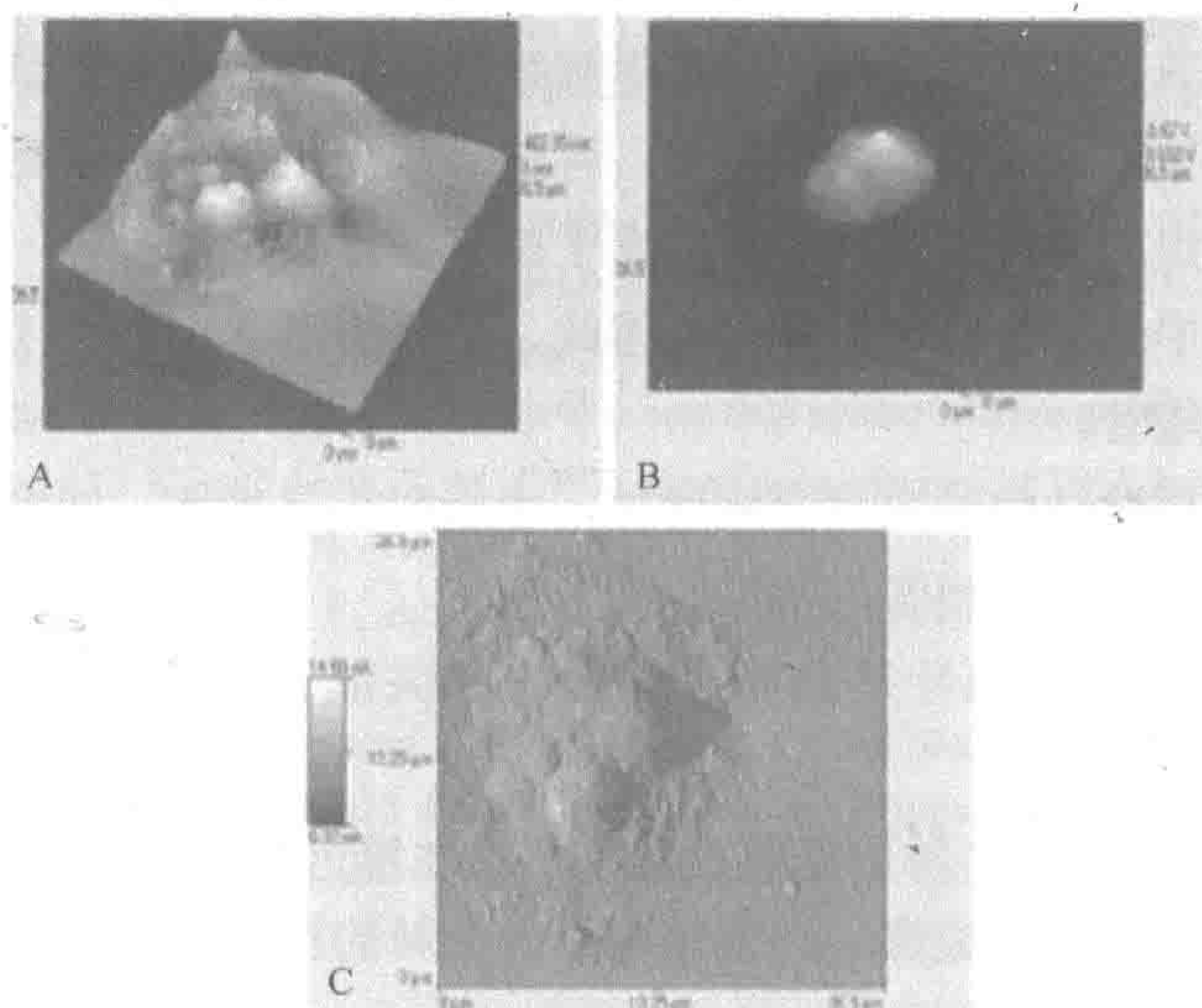


图 20.6　5μmol/L DOX 培养的中国仓鼠卵巢细胞近场扫描光学显微镜图像：（A）形态；（B）荧光；（C）内部信号反馈（彩图请扫封底二维码）

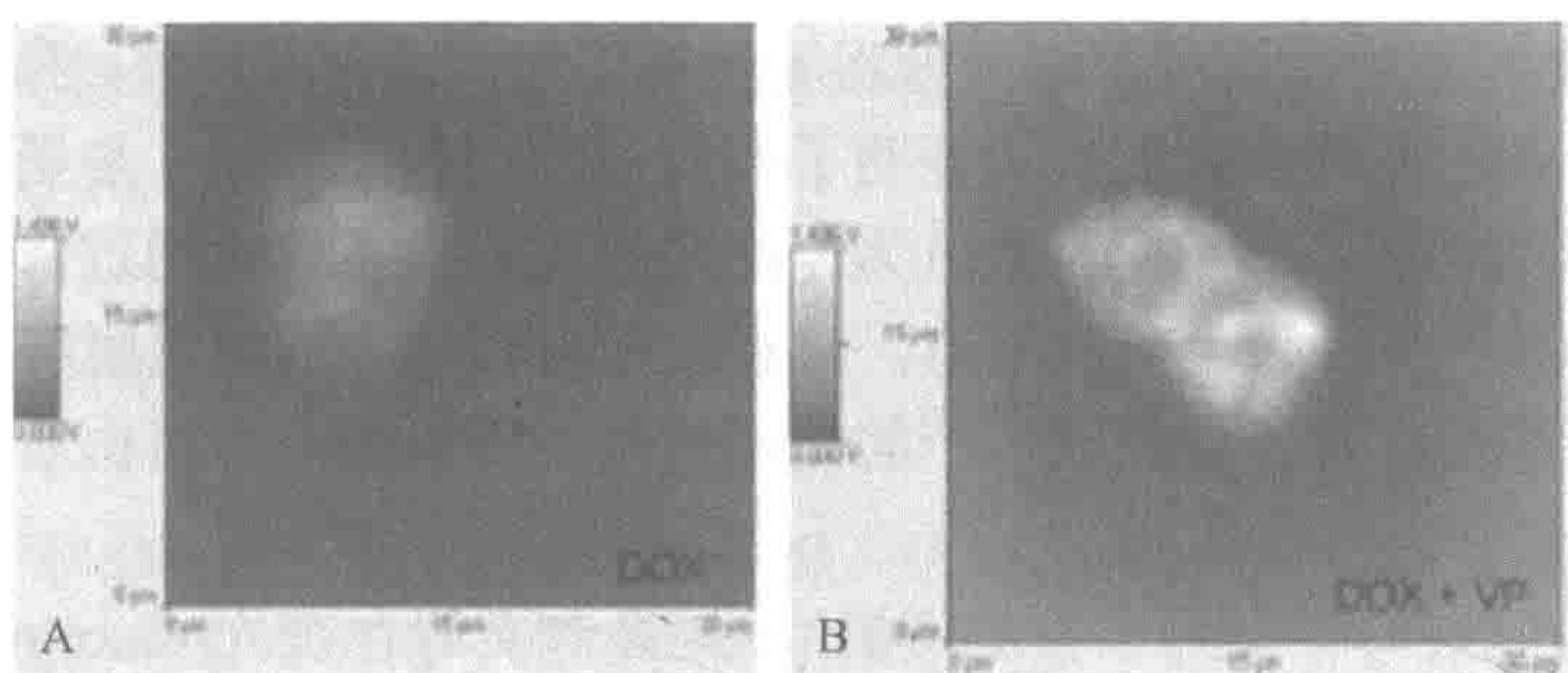


图 20.7　用 5μmol/L DOX（A）和 5μmol/L DOX+5μmol/L 维拉帕米（B）培养的中国仓鼠卵巢细胞近场光学显微镜图像（彩图请扫封底二维码）

20.4 注 意 事 项

1. 固定的细胞应该尽可能平坦（高度＜500nm），使探头不会超出反馈系统或损坏。

2. 为避免损坏压电扫描仪，扫描台不要用力过猛。

3. 为避免损坏压电扫描仪，注意不要让探头触碰台面。

4. 避免损坏探针和样品，小心处理探头，特别注意探头和探头架的底部。每当针头从显微镜台取出时，尖“向上”扣在数据采集工具上，以升高尖头远离样品的安全距离。当放置探头到测定台上时，或小心地将它放在一个桌子或其他平面上时，将 Z 轴高度翼形螺钉顺时针旋转一整圈。不管是使用 Z 电机还是指旋螺丝降低时，都要观看视频监视器上的图像，以确保探头不会碰到样品或台面上。

5. 由于探头极其脆弱，注意小心拿放。

6. 近场光学显微镜探针是一端锥形的光纤。剥离包层并切割光纤时需要格外小心。

7. 首先，在反射物镜，应该用照相机帮助探针尖头的定位。其次，探针尽可能靠近样品表面，并且关闭所有的灯后，用透射物镜将探针位于激光光源的位置。

8. 一旦探针被带到反馈系统的位置，环境必须无振动。不能走动、不能开门或关门，关门或在旁边走动或触摸实验装置的桌子都容易打破探针。

9. 暴露于光中会损坏光电倍增管。因此，必须关闭 Aurora-2 上的光，以防止扫描开始前损坏光电倍增管。

10. 近场光学显微镜信号突然急剧增加，表示探头已损坏，光电倍增管电压必须立即降低，以防止损坏光电倍增管。

11. 耦合的激光进入探针是获得最佳激光的关键。探针尖头在反馈时不要连接激光。

12. *P-I-D* 应设定很低（特别是整数）以便它在接近样品时探针尖头不跳动。

13. 要获得最好的形貌成像，必须优化每一个新的探针尖头的 *P-I-D* 设置。

致谢

本项工作生物获得了美国能源部生物学和环境研究办公室下属的 UT-Battelle 责任有限公司合同 DE-AC05-00OR22725、橡树岭国家实验室指导研究和发展项目（先进的等离子传感器项目）的资助。M. Wabuyele 和 M. Culha 获得橡树岭国家实验室博士后研究助理计划指定资助人资格。感谢橡树岭国家实验室和橡树岭科学与教育研究所共同资助和管理。

参考文献

[1] Abbe, E. (1873) Beitrage zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. Mikrosc. Anat. Entwicklungsmech*. 9, 413–468.

[2] Synge, E. H. (1928) A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region. *Philos. Mag*. 6, 356–362.

[3] Ash, E. A. and Nicholls, G. (1972) Super-resolution aperture scanning microscope. *Nature (Lond.)* 237, 510–512.

[4] Mrksich, M. and Whitesides, G. M. (1995) Patterning self-assembled monolayers using microcontact printing: a new technology for biosensors. *Trends Biotechnol.* 13, 228–235.

[5] Lange, F., Cambi, A., Huijbens, R., de Bakker, B., Rensen, W., Garcia-Parajo, M., van Hulst, N., and Figdor, G. C. (2001) Cell biology beyond the diffraction limit: near-field scanning optical microscopy. *J. Cell Sci.* 114, 4153– 4160.

[6] Betzig, E. and Chichester, R. (1993) Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. *Science* 262, 1422–1424.

[7] Zenobi, R. and Deckert, V. (2000) Scanning near-field optical microscopy and spectroscopy as a tool for chemical analysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 1747– 1757.

[8] Doyle, R. T., Szulzcewski, M. J., and Haydon, P. G. (2001) Extraction of near-field fluorescence from composite signals to provide high resolution images of glial cells. *Biophys. J.* 80, 2477–2482.

[9] Moers, M. H., Kalle, W. H., Ruiter, A. G., Wiegant, J. C., Raap, A. K., Greve, J., de Grooth, B. G., and Van Hulst, N. F. (1996) Fluorescence in situ hybridization on human metaphase chromosomes detected by near-field scanning optical microscopy. *J. Microsc.* 182, 40–45.

[10] Garcia-Parajo, M. F., Veerman, J. A., Segers-Nolten, A. G., and Van Hulst, N. F. (1998) Near-field optical and shear-force microscopy of single fluorophores and DNA molecules. *Ultramicroscopy* 71, 311–319.

[11] Garcia-Parajo, M. F., Veerman, J. A., Segers-Nolten, G. M. J., de Grooth, B. G., Greve, J., and van Hulst, N. F. (1999) Visualising individual green fluorescent proteins with a near field optical microscope. *Cytometry* 36, 239–246.

[12] Kirsch, A. K., Meyer, C. K., and Jovin, T. M. (1997) Shear force imaging of DNA in a near-field scanning optical microscope. *J. Microsc.* 185, 396–401.

[13] Betzig, E., Chichester, R. J., Lanni, F., and Taylor, D. L. (1993) Near-field fluo- rescence imaging of skeletal actin. *Bioimaging* 1, 129–135.

[14] Enderle, T., Ha, T., Ogletree, D. F., Chemla, D. S., Magowan, C., and Weiss, S. (1997) Membrane specific mapping and colocalization of malarial and host skeletal proteins in the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte by dualcolor near-field scanning optical microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 520–525.

[15] Nagy, P., Jenei, A., Kirsch, A. K., Szollosi, J., Damjanovich, S., and Jovin, T. M. (1999) Activation-dependent clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase detected by scanning near-field optical microscopy. *J. Cell. Sci.* 112, 1733– 1741.

[16] Deckert, V., Zeisel, D., Zenobi, R., and Vo-Dinh, T. (1998) Near-field surface enhanced Raman imaging of dye-labeled DNA with 100-nm resolution. *Anal. Chem.* 70, 2646–2650.

[17] Garcia-Parajo, M. F., Veerman, J. A., van Noort, S. J. T., deGrooth, B. G., Greve, J., and van Hulst, N. F. (1998) Near-field optical microscopy for DNA studies at the single molecular level. *Bioimaging* 6, 43–53.

[18] Emory, S. R. and Nie, S. (1997) Near-field surface-enhanced Raman spectroscopy on single silver nanoparticles. *Anal. Chem.* 69, 2631–2635.

[19] Zeisel, D., Deckert, V., Zenobi, R., and Vo-Dinh, T. (1998) Near-field surface-enhanced Raman spectroscopy of dye molecules adsorbed on silver island films. *Chem. Phys. Lett.* 283, 381–385.

[20] Schmalenberg, K. E., Thompson, D. M., Buettner, H. M., Uhrich, K. E., and Garfias, L. F. (2002) In situ stepwise surface analysis of micropatterned glass substrates in liquids using functional near-field scanning optical microscopy. *Langmuir* 18, 8593–8600.

[21] Dunn, R. C. (1999) Near-field scanning optical microscopy. *Chem. Rev.* 99, 2891–2927.

[22] Merrit, M. V., Mrksich, M., and Whitesides, G. M. (1997) Using self-assembled monolayers to study the interactions of man-made materials with proteins, in *Principles of Tissue Engineering* (Lanza, R. P., Langer, R., and Chick, W., eds.), R. G. Landes Company, Austin, TX, pp. 211–223.

[23] Deckert, V. (2003) Near-field imaging in biological and biomedical applications, in *Biomedical Photonics Handbook* (Vo-Dinh, T., ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 12–19.

[24] Zaman, G. J. R., Flens, M. J., van Leusden, M. R., et al. (1994) The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8822–8826.

[25] Shapiro, A. B., Fox, K., Lam, P., and Ling, V. (1999) Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone: evidence for a third drug-binding site. *Eur. J Biochem.* 3, 841–850.

[26] Krisnamachary, N. and Center, M. S. (1993) The MRP gene associated with a non-P-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-kDa membrane bound glycoprotein. *Cancer Res.* 53, 3658–3661.

[27] Barrand, M. A., Heppell-Parton, A. C., Wright, K. A., Rabbits, P. H., and Twentyman, P. R. (1994) A 190-kilodalton protein overexpressed in non-P-glycoprotein-containing multidrug-resistant cells and its relationship to the MRP gene. *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 110–117.

[28] Borst, P. (1999) Multidrug resistance: a solvable problem? *Ann. Oncol.* 10, 162–164.

[29] Sharom, F. J. (1997) The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? *J. Membr. Biol.* 160, 161–175.

[30] Sauna, E. Z., Smith, M. M., Muller, M., Kerr, M. K., and Ambudkar, V. S. (2001) The mechanism of action of multidrug-resistance-linked p-glycoprotein. *J. Bio- energ. Biomembr.* 33, 481–491.

[31] Stride, D. B., Cole, C. P. S., and Deeley, G. R. (1999) Localization of substrate specificity domain in the multidrug resistance proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 22,877–22,883.

[32] Hamilton, K. O., Topp, E., Makagiansar, I., Siahaan, T., Yazdanian, M., and Audus, L. K. (2001) Multidrug resistance-associated protein-1 functional activity in Calu-3 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 3, 1199–1205.

[33] Chen, Y., Pant, A. C., and Simon, M. S. (2001) P-Glycoprotein does not reduce substrate concentration from the extracellular leaflet of the plasma membrane in living cells. *Cancer Res.* 61, 7763–7769.

索　引

A

B

C

D

E

F

G

H

J

Q

R

S

T

W

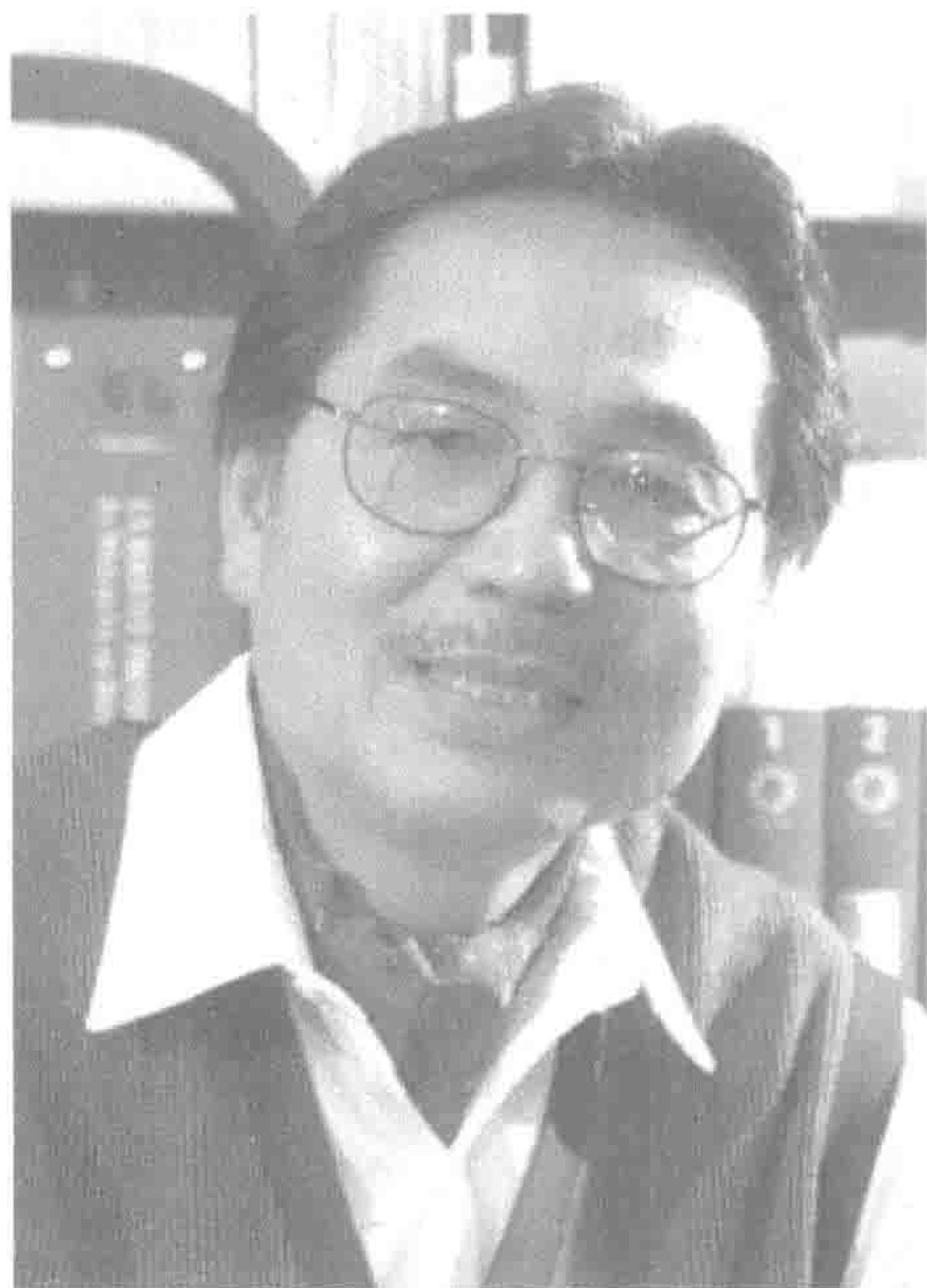
X

Y

Z

其　他

主编简介



Tuan Vo-Dinh 是一位企业理事、集团领导和田纳西州高级生物医学光子学中心橡树岭国家实验室主任（ORNL)。Vo-Dinh 博士是一位美国籍越南人，他在西贡（今胡志明市）完成了他的高中教育，后来去欧洲追求他研究的梦想。1975 年，他获得了瑞士联邦理工学院（ETH）生物物理化学博士学位。他的研究一直专注于对环境保护和人类健康改善先进技术的开发。他的研究涉及激光光谱学、分子影像学、医学诊断、癌症检测、化学传感器、生物传感器、生物芯片、纳米传感器和纳米技术。

Vo-Dinh 博士已经发表了 300 多篇同行评审科学论文，他是光谱教科书的作者，是 4 本书的主编。他拥有超过 28 项专利，其中 6 项已经授权给环境和生物技术公司用于商业开发。Vo-Dinh 博士是美国化学家协会会员、国际光学工程学会（SPIE）会员，并担任分子光谱学、分析化学、生物医学光学和医疗诊断等各种国际刊物编委。他还通过广泛参加政府和工业界咨询委员会为科学社团服务。

此外，Vo-Dinh 博士共获 7 项 R&D 100 大奖，他是“研发最具科学技术优势”的开创性研究和创新技术发明者。这些奖项是奖励他发明的化学剂量计（1981）、抗体生物传感器（1987）、SERODS 光学数据存储系统（1992）、环境污染物斑点试验（1994）、用于 DNA 检测的 SERS 基因探针技术（1996）、用于医学诊断和病原菌检测的多功能生物芯片（1999）和 Ramits 传感器（2003）。他获得的奖项还有：应用光谱学会（1988）；多克-鲁西永奖（法国，1989）；橡树岭国家实验室科学家年度大奖（1992）；托马斯•杰斐逊奖，马丁•玛丽埃塔公司金奖（1992）；还有两个技术转让卓越奖，联邦实验室联合体年度奖（1995、1986），田纳西州发明家发明者协会（1996）；洛克希德马丁公司的技术商业化奖（1998），UT-Battelle（2003）杰出发明家奖，和橡树岭国家实验室杰出科学家年奖（2003）。1997 年，美国能源署向 Vo-Dinh 博士颁发了对公民健康杰出贡献特别奖。